



Estudio de hongos aislados de la Faja Pirítica Ibérica implicados en la oxidación del manganeso

Memoria que presenta
Alfonso José González Muñoz
para optar al título de Doctor
por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2017

Estudio de hongos aislados de la faja pirítica ibérica implicados en la oxidación del manganeso

Visado en Sevilla, a 9 de mayo de 2017

EL DIRECTOR:



Dr. D. Cesáreo Sáiz Jiménez
Profesor de Investigación

Instituto de Recursos Naturales y
Agrobiología de Sevilla
CSIC

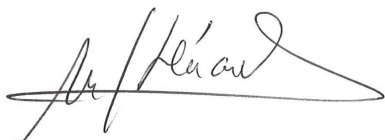
LA DIRECTORA:



Dra. Dª Ana Z. Miller
Investigadora

Instituto de Recursos Naturales y
Agrobiología de Sevilla
CSIC

LA TUTORA:



Dra. Dª. Maria Jesús Hernández Arnedo
Catedrático de Escuela Universitaria

Departamento de Cristalografía, Mineralogía
y Química Agrícola
Facultad de Química
Universidad de Sevilla

**DOCTOR D. CESÁREO SÁIZ JIMÉNEZ, PROFESOR DE
INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES
Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO DE SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

Certifica:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Estudio de hongos aislados de la Faja Pirítica Ibérica implicados en la oxidación del manganeso”, presentada por D. Alfonso José González Muñoz para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Agroquímica, Microbiología Ambiental y Conservación de Suelos, bajo mi dirección reuniendo todos los requisitos exigidos.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado.

En Sevilla, a 9 de mayo de 2017



Fdo. Prof. Dr. D. Cesáreo Sáiz Jiménez

**DOCTORA D^a. ANA ZELIA MILLER, INVESTIGADORA DEL
INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE
SEVILLA DEL CONSEJO DE SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS**

Certifica:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Estudio de hongos aislados de la Faja Pirítica Ibérica implicados en la oxidación del manganeso”, presentada por D. Alfonso José González Muñoz para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Agroquímica, Microbiología Ambiental y Conservación de Suelos, bajo mi dirección reuniendo todos los requisitos exigidos.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado.

En Sevilla, a 9 de mayo de 2017



Fdo. Dra. D^a. Ana Zélia Miller

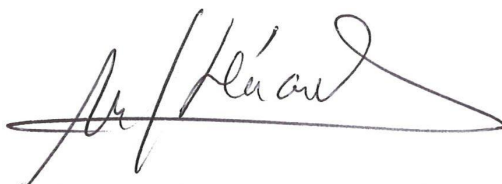
**DOCTORA D^a. MARÍA JESÚS HERNÁNDEZ ARNEDO,
CATEDRÁTICA DE ESCUELA UNIVERSITARIA DEL
DEPARTAMENTO DE CRISTALOGRAFÍA, MINERALOGÍA Y
QUÍMICA AGRÍCOLA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

Certifica:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Estudio de hongos aislados de la Faja Pirítica Ibérica implicados en la oxidación del manganeso”, presentada por D. Alfonso José González Muñoz para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla, adscrita al Programa de Doctorado Recursos Naturales y Medio Ambiente, bajo mi supervisión y reuniendo todos los requisitos exigidos.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado.

En Sevilla, a 9 de mayo de 2017

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. J. Hernández Arnedo", with a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo. Dra. D^a. Maria Jesús Hernández Arnedo


**DOCTOR D. JOSÉ ENRIQUE FERNÁNDEZ LUQUE, DIRECTOR
DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y
AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO DE SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

Certifica:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Estudio de hongos aislados de la Faja Pirítica Ibérica implicados en la oxidación del manganeso”, presentada por D. Alfonso José González Muñoz para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Agroquímica, Microbiología Ambiental y Conservación de Suelos, bajo la dirección del Prof. Dr. D. Cesáreo Sáiz Jiménez y la Dra. D^a Ana Z. Miller, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado.

En Sevilla, a 9 de mayo de 2017



Fdo. Dr. D. José Enrique Fernández Luque

Agradecimientos

Dicen que es de bien nacidos... Y yo no puedo dejar pasar esta oportunidad. Porque me han echado muchas manos. Y porque se merecen este pequeño reconocimiento.

A mis padres, a Meli y Antonio. Porque hubo un día, no recuerdo bien cuando, que comprendí lo que estuvieron dispuestos a sacrificar por nosotros, mis hermanos y yo. Me di cuenta cómo lo único importante para ellos en sus vidas hemos sido nosotros, y cómo no han escatimado una sola gota de sudor para que pudiéramos tener la mejor educación posible. Y en especial a mi madre, a Meli, no solo por ser la verdadera impulsora de esta Tesis Doctoral, con su apoyo incansable, sino por mucho más aún. Por ser para mí la criatura más generosa y constante que jamás conocí. Por todo ello quiero aprovechar esta, como la oportunidad que tengo para agradecerles la vida y las oportunidades infinitas que nos proporcionaron.

A mis abuelos en el Cielo, a Pepa y Curro. Me resulta imposible evitar emocionarme al escribir estas líneas. Porque lamento que mi obsesión por formarme y que estéis orgullosos de mi trabajo ha provocado que no hubierais podido cumplir parte de vuestras ilusiones con respecto a mí. Por tantas veces que os escuché decirme que queríais verme casado, conocer mis hijos, la familia que por fin conseguí formar. Porque os he perdido a los dos en solo seis de los meses que estuve trabajando en esta Tesis Doctoral. Porque habéis sido como mis padres. Porque me habéis querido como a un hijo. Porque estoy mucho más solo sin vosotros. Porque no sabéis cuánto os extraño.

A Ángel, mi jefe, que durante tantos años, tantas tardes, tantos fines de semana y tantos días de ausencias nunca tuvo una palabra de reproche.

A las doctorandas del Grupo de Agroquímica, Microbiología Ambiental, y Conservación de Suelos del IRNAS. Marta, Irene, Sara, Ángela. Un placer haberos conocido.

A Isa y Valme, el motor del grupo y la experiencia en el campo. Por haber sido siempre un punto de apoyo y ánimo. Porque os deseo el mejor futuro.

A mis tutoras, a Matilde y María Jesús, por el apoyo constante y sus palabras de tranquilidad y ánimo.

A Pedro, por ser el primero con el que tuve conciencia de cómo se tiene que rendir en investigación y en quién debía fijarme. Porque no se suelen escuchar de Cesáreo palabras tan buenas de todo el mundo. Porque aunque emigraste demasiado pronto te preocupaste de dejarme lo más encaminado posible. Porque te mereces lo mejor Dr. Martín Sánchez.

A Ana Zélia, mi codirectora. Por ser siempre tan positiva, por ayudarme tanto, por no tener nunca problema en nada, por tu interés en mi y por tu inestimable ayuda en las técnicas de microscopía.

A Cesáreo. Directamente esta Tesis no habría sido posible sin ti. Porque te debo mucho. Porque aún no entiendo qué hice para merecerme la atención que me has dedicado. Por las incontables oportunidades. Desde el principio y hasta especialmente el final, me has empujado a continuar y ayudado a terminar. Por tu capacidad y derroche en el esfuerzo, tu ejemplo en el trabajo, tu compromiso con tu grupo y tu generosidad con los que te rodean. Muchas gracias por todo.

Y a ti, Eli. Porque ha sido muy duro. Porque este probablemente sea el colofón a un camino de 15 años de preparación, de semanas de exámenes, de vacaciones para preparar convocatorias de Septiembre. Quince años en los que has querido estar a mi lado. Por tu paciencia, por tu apoyo, por tu comprensión, por apostar por mi, por quererme tanto, por nuestro Alfonso Manuel, y por toda la vida que nos queda por delante juntos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

En los últimos años el grupo de investigación “Microbiología Ambiental y Patrimonio Cultural”, del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla ha llevado a cabo diversos estudios en cuevas y minas, donde han demostrado el papel que los microorganismos juegan en el ciclo biogeoquímico del manganeso.

En un túnel excavado en granito en el siglo XVI destinado a la captación de agua para la ciudad de Oporto (Portugal), hoy en desuso, se apreció la existencia de manchas de color negro en sus paredes. El análisis de estas manchas mostró que, en su mayor parte, estaban compuestas por óxidos de manganeso (Miller et al., 2012a).

En el túnel de granito se pudo comprobar, además, la existencia de unas largas estructuras filamentosas ornamentadas recubiertas por una vaina de manganeso, a las que se han denominado filamentos reticulados. Estas raras estructuras, que se encontraron sobre óxidos de manganeso (Figura 1.1) fueron anteriormente descritas por Melim et al. (2008), preguntándose si tenían o no un origen biológico. Hoy día se sabe que están formadas por microorganismos ya que en un estudio con el microscopio electrónico de transmisión se pudieron observar las células en el interior de la vaina. Hasta hoy es una incógnita el tipo de microorganismo que interviene en su proceso de formación (Miller et al. 2012b). Estos datos ponen de manifiesto el interés en estudiar con mayor detalle la síntesis biogénica de óxidos de manganeso.



Figura 1.1. Filamentos reticulados sobre fondo de óxidos de manganeso al microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Miller et al., 2012b).

En la cueva de Lascaux (Montignac, Francia) también existían manchas de color negro sobre los sedimentos arcillosos, demostrando que ello era debido a la deposición de óxidos de manganeso biogénico por acción del hongo *Acremonium nepalense* (Saiz-Jimenez et al., 2012).

Uno de los posibles abordajes al tema es la búsqueda de microorganismos capaces de inducir biogénicamente la síntesis de tales óxidos en el ambiente, y a tal fin se consideró oportuno explorar la zona de la Faja Pirítica Ibérica (FPI), donde abundan las minas de manganeso, hoy abandonadas.

1.2. Manganeso. Aparición y usos

Los inicios en el empleo del manganeso se documentan en el Paleolítico, cuando el hombre utilizaba el dióxido de manganeso como pintura de color negro para sus expresiones artísticas en cuevas. Actualmente, se usa para la eliminación de las coloraciones verdes en el vidrio de origen férrico (Scaeteanu et al., 2013).

Carl Wilhelm Scheele propuso el manganeso como elemento en 1771, pero fue descubierto por Johan Gottlieb Gahn en 1774 tras calcinar dióxido de manganeso con carbón vegetal.

En el siglo XVIII, el dióxido de manganeso se convirtió en materia prima para la síntesis del cloro. Los agentes blanqueantes que contienen cloro e hipoclorito se obtienen a partir de mineral de manganeso.

El manganeso en su forma elemental es un metal plateado que en la naturaleza aparece combinado con otros elementos como oxígeno, carbono, silicio, azufre y cloro en compuestos mangánicos.

Las principales fuentes de manganeso se encuentran en Rusia, Australia, Gabón, Brasil, Sudáfrica e India (Das et al., 2011). En las profundidades de los océanos se encuentran nódulos polimetálicos, que pueden contener entre el 20-25% de manganeso. Estos podrían ser una importante fuente de manganeso en el futuro, pero el método de recuperación de manganeso procedente de arenas en la minería del fondo marino implica ciertas dificultades.

Los usos del manganeso son numerosos: producción de hierro y acero (mejora las características en dureza, fuerza y rigidez), fabricación de baterías de celda seca, producción de permanganato potásico, fabricación de vidrio, blanqueamiento de tejidos, fósforos y pirotecnia.

Hoy día, los compuestos de manganeso de mayor interés incluye el MMT (tricarbonil metilciclopentadienil manganeso) que fue introducido en 1974 como agente aumentador de octanos y antidetonante. La combustión del MMT en los automóviles con el esperado incremento de los niveles de manganeso en el ambiente ha provocado un aumento en la preocupación de los riesgos sobre la salud asociados a la exposición al manganeso ambiental.

Usos más novedosos incluyen el antifúngico Maneb para aplicación foliar (etilen-1,2-bis-ditiocarbamato de manganeso) y los compuestos de coordinación que son usados en medicina para el tratamiento de varias enfermedades. El primer uso terapéutico conocido del manganeso fue en el tratamiento de la psoriasis, en combinación con vitamina B₁ en 1966 (BiolabMedical Unit, 2015).

1.3. *El manganeso en el suelo*

El manganeso es, junto con el hierro, el metal pesado más abundante de la corteza terrestre. Constituye cerca del 0,4 al 1,6 % de todas las clases de rocas constituyentes de la corteza terrestre, de las que las ultrabásicas y basálticas son las rocas con mayor contenido en este metal.

El manganeso no se presenta como metal libre en el ambiente. Se encuentra combinado con otros elementos en más de 100 minerales (sulfuros, carbonatos, fosfatos, boratos), siendo el más difundido la pirolusita (MnO₂), seguido de rodocrosita (MnCO₃), y hausmanita (Mn₃O₄).

El suelo puede contener hasta 9000 ppm de manganeso, con un promedio de 440 ppm. El manganeso, si aparece en el suelo como manganeso intercambiable, lo hace como óxido de manganeso, manganeso orgánico o como componente de minerales, como silicatos de ferromanganeso. La cantidad de manganeso disponible está principalmente influenciada por la reacción del suelo, el contenido de materia orgánica y la humedad.

La bioquímica del manganeso en el suelo es compleja, porque se presenta en varios estados de oxidación (0, II, III, IV, VI y VII), mientras que en sistemas biológicos ocurre preferiblemente como II, III y IV. El manganeso divalente (Mn II) es la forma más soluble de manganeso en el suelo, mientras que el tetravalente es insoluble. El estado tetravalente más estable está habitualmente representado por el dióxido de manganeso (MnO₂).

El manganeso es soluble en ambientes con bajo pH y condiciones reductoras, precipitando rápidamente a elevados valores de pH y condiciones oxidantes. Por

tanto, su distribución está muy afectada por las condiciones que gobiernan su valencia.

El manganeso es absorbido por la planta como Mn^{2+} , tanto por la raíz como por las hojas. Las necesidades cuantitativas son pequeñas, pero fluctúan más que para cualquier otro micronutriente. Entre otros aspectos, es esencial en la respiración celular y metabolismo del nitrógeno, es activador de enzimas del ciclo de Krebs e interviene en la síntesis de proteína, ya que participa en la asimilación del amonio. Igualmente interviene en la liberación del O_2 en la fotólisis del agua durante la fotosíntesis (Lambers et al., 2015).

Las carencias se suelen manifestar en suelos con alto potencial de oxidación que provoca la insolubilización de las formas de Mn. Los síntomas de la deficiencia de Mn se manifiestan en la clorosis, que por lo general aparece en hojas jóvenes, amarilleando el limbo, e incluso, tomando un color blanco, mientras las nerviaciones permanecen con el color verde (aspecto de tela de araña). Produce la desorganización de las membranas del núcleo, de las mitocondrias y especialmente de la membrana tilacoidal.

La acumulación de Mn^{2+} es tóxica para la mayoría de las plantas cultivadas. En suelos ricos en materia orgánica, con pH menor o igual a 5,5 y con elevadas condiciones reductoras, se pueden producir acumulaciones de este elemento. Esto es debido a que a pH bajos su forma asimilable (bivalente) es muy abundante y puede dar lugar a su absorción por las plantas en cantidades elevadas. El Mn parece ser el único micronutriente que puede acumularse en las plantas por absorción excesiva. Los síntomas son más visibles en plantas jóvenes, manifestándose como manchas marrones en hojas (Lambers et al., 2015).

1.4. Tipos de minerales del manganeso

El manganeso puede formar más de 30 minerales diferentes en sus formas de óxido o hidróxido. En ausencia de oxígeno, el manganeso (II) aparece la mayoría de las veces adsorbido a minerales, mientras que en presencia de oxígeno, el manganeso III y IV aparece como óxido o hidróxido en estado sólido (Ulrich, 2007).

Los principales minerales se muestran en la Tabla 1 (Post, 1999; Scheinost y Daniel, 2005; Spiro et al., 2008).

Tabla 1.1. Minerales de manganeso (modificado de diversos autores).

	Denominación	Name	Fórmula
1	Hausmanita	Hausmanite	Mn_3O_4
2	Buserita	Buserite	$Na_4Mn_{14}O_{27} \cdot 21H_2O$
3	Manganita	Manganite (γ - $MnOOH$)	$MnOOH$
4	Nsutita	Nsutite (γ - MnO_2)	$Mn(O,OH)_2$
5	Birnesita	Birnessite	$(Na, Ca)Mn_7O_{14} \cdot 2.8 H_2O$
6	Vernadita	Vernadite (δ - MnO_2)	$MnO_2 \cdot nH_2O$
7	Calcofanita	Chalcophanite	$ZnMn_3O_7 \cdot 3H_2O$
8	Litioforita	Lithiophorite	$LiAl_2(Mn^{4+}Mn^{3+})O_6(OH)_6$
9	Todorokita	Todorokite	$(Na, Ca, K)_x(Mn^{4+}Mn^{3+})_6O_{12} \cdot 3.5H_2O$
10	Romanechita	Romanechite	$Ba_{0.66}(Mn^{4+}Mn^{3+})_5O_{10} \cdot 1.34H_2O$
11	Holandita	Hollandite (α - MnO_2)	$Ba_x(Mn^{4+}Mn^{3+})_8O_{16}$
12	Criptomelano	Cryptomelane	$K_x(Mn^{4+}Mn^{3+})_8O_{16}$
13	Coronadita	Coronadite	$Pb_x(Mn^{4+}Mn^{3+})_8O_{16}$
14	Pirolusita	Pyrolusite (β - MnO_2)	MnO_2
15	Ramsdelita	Ramsdellite	MnO_2
16	Groutita	Groutite (α - $MnOOH$)	$MnOOH$
17	Feitknechtita	Feitknechtite (β - $MnOOH$)	$MnOOH$

1.5. Minas de manganeso en el mundo

La producción mundial estimada de minerales de manganeso durante 2014 se situó en unas 18×10^6 de toneladas de mineral, lo que significó un aumento del 6,12% respecto al año 2013 (U.S. Geological Survey, 2014).

Seis países: Sudáfrica (26,1%), China (17,8%), Australia (17,2%), Gabón (11,1%), Brasil (6,1%) e India (5,22%) se repartieron el 84% de la producción mundial durante 2014.

La producción de manganeso está íntimamente relacionada a la del acero, ya que entre el 90 y el 95 % de dicha sustancia se consume, a nivel mundial, por la industria siderúrgica. El mineral de mejor calidad (45-52% de metal contenido) se utiliza para la fabricación de ferromanganeso o silicomanganeso, que se añade en el alto horno para recuperar el exceso de azufre y de oxígeno. Las nuevas tecnologías han reducido, sin embargo, el consumo unitario de manganeso metal

por tonelada de acero producida. Los minerales de menor ley (828-32 % de metal contenido se utilizan directamente para la obtención de arrabio.

Las reservas mundiales probadas de minerales de manganeso se elevan a unos 570×10^6 de toneladas de mineral y los recursos mundiales son muy amplios, pero se encuentran irregularmente distribuidos. Sudáfrica (26,3 % de las reservas mundiales), Ucrania (24,6%), Australia (17%), Brasil (9,5%), India (9,1%) y China (7,7%) acaparan el 94,2% del total mundial de reservas. Cantidades potenciales muy importantes de manganeso se encuentran en los nódulos polimetálicos existentes en los fondos marinos, sobre todo en la zona ecuatorial del Océano Pacífico.

Debido a la importancia del manganeso en la industria siderúrgica y a su irregular distribución geopolítica, este metal se ha convertido en un recurso altamente estratégico.

El futuro del manganeso se encuentra estrechamente ligado a la evolución que siga la industria del acero, siendo previsible un incremento moderado de la producción, tal y como acaece actualmente.

La producción en España de mineral de manganeso cesó definitivamente en 1973, con el cierre de las minas de Soloviejo (Huelva). En los primeros años de la década de los 90 se ha renovado el interés por este mineral, abriéndose pequeñas explotaciones con propósito investigador en Soloviejo y la Reserva de Bolaños en Ciudad Real, cuyas producciones no fueron reflejadas en la estadística minera (Trio Maseda y Guillermo Ortuño, 1993-1994).

En el Inventario Nacional de Recursos de Manganeso, realizado en 1982 por el IGME, se estimaron en 64.000 Tm de metal contenido en los recursos identificados. A estos, hay que añadir los medidos en la Reserva de Bolaños, investigada durante el periodo 1985-1989, en la que se han cubicado 530.444 Tm de manganeso contenido con ley de corte 1,04%, 381.632 Tm con ley de corte 3,06% ó 54.164 Tm con ley de corte 7,2%.

1.6. La Faja Pirítica Ibérica (FPI)

La FPI es una de las provincias metalogénicas más importantes de Europa, con grandes yacimientos de pirita y sulfuros complejos (Cu, Pb, Zn) y con una enorme cantidad de pequeñas mineralizaciones de manganeso. Se trata de una banda situada en el SO de la Península Ibérica y dentro de la denominada “Zona Sudportuguesa”, división establecida por Lotze en 1945 para el Macizo Hercínico

Ibérico. La FPI queda limitada al Norte por el Dominio Pulo do Lobo y al Sur por el Dominio SO Portugués, extendiéndose a través de unos 230 km de longitud, desde la Costa Oeste de Portugal hasta la provincia de Sevilla, y unos 35-40 km de anchura.

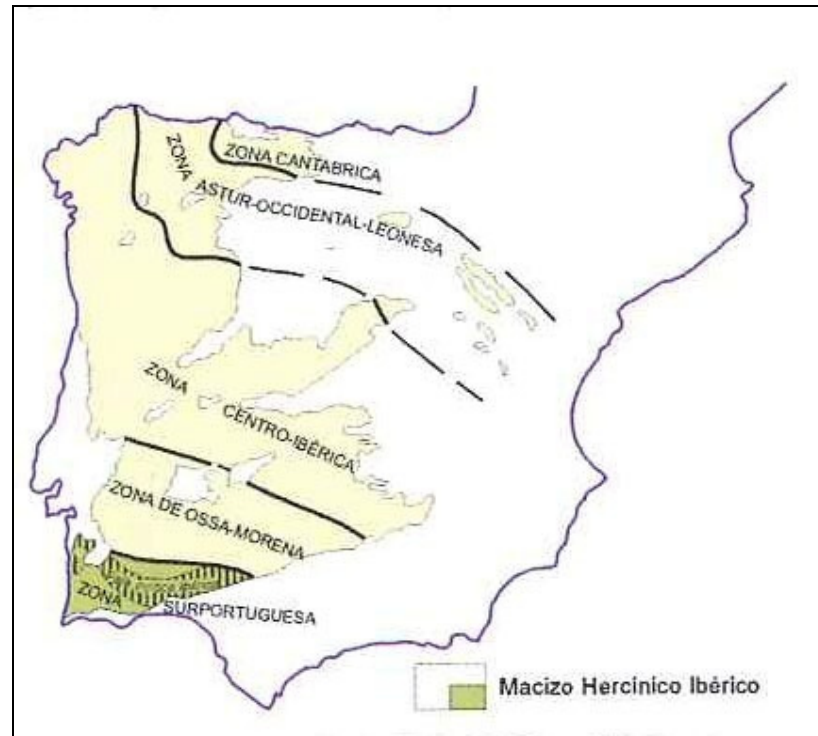


Figura 1.2. Situación de la Faja Pirítica Ibérica dentro de la subdivisión del Macizo Hercínico Ibérico.

La Zona Sudportuguesa se subdivide en cinco dominios que, siguiendo la descripción de Oliveira (1990), serían de Norte a Sur: Cinturón ofiolítico Beja-Acebuche, Antiforme del Pulo do Lobo, Faja Pirítica Ibérica, Flysch del Bajo Alentejo y Antiformes del Suroeste de Portugal.

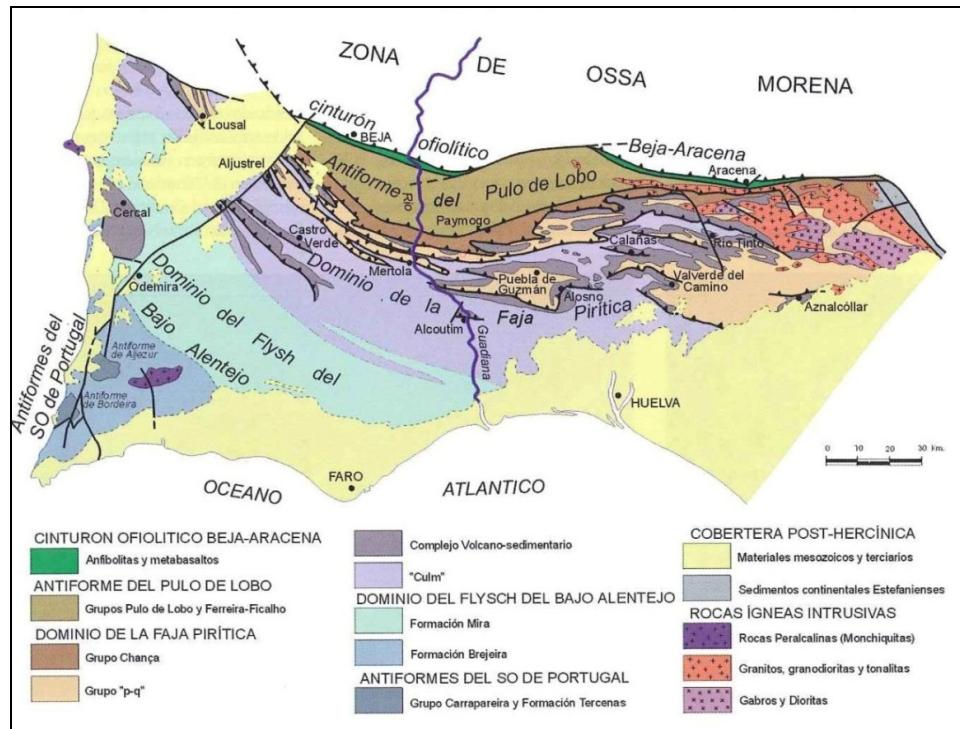


Figura 1.3. Esquema geológico de la zona Sudportuguesa.

Geológicamente, está constituida por materiales de las tres grandes unidades estratigráficas definidas para el conjunto del área Sudportuguesa: Grupo de Pizarras y cuarcitas, Complejo Vulcanosedimentario y Grupo Culm. Estos tres conjuntos litoestratigráficos fueron definidos por Strauss (1970) en Lousal (Portugal) y se han mantenido sin modificaciones fundamentales hasta nuestros días.

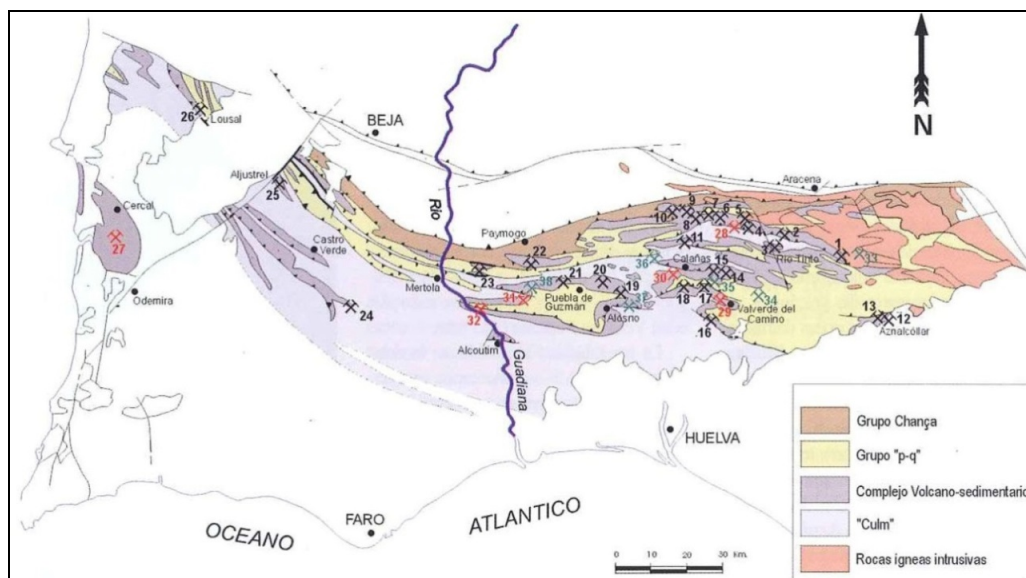


Figura 1.4. Esquema geológico de la Faja Pirítica Ibérica.

De estas unidades estratigráficas, la relevante para nuestro estudio es el Complejo Vulcano-Sedimentario (CVS). Tomando la información del Plan de Investigación elaborado por CRS Ingeniería (2014) encontramos que el CVS supone una importante acumulación de rocas volcánicas debidas a una intensa actividad eruptiva correspondiente a la fase sinorogénica temprana, con frecuentes episodios catastróficos, durante el Struniense-Viseiense (Devónico superior-Carbonífero inferior). Este conjunto tiene una especial relevancia en la FPI por ser en él donde se hallan los clásicos y famosos yacimientos de sulfuros masivos y de manganeso. Este vulcanismo responde a características de la asociación espilita-queratófido, típicamente submarino, con amplio predominio de los términos ácidos (riolitas y dacitas) sobre los básicos (basaltos). De forma generalizada las rocas volcánicas tienen una intensa alteración espilitica e hidrotermal que enmascara su petrología original. Las variaciones de potencia y de facies son constantes en el conjunto, lo que plantea grandes problemas cartográficos. Se puede estimar que la potencia varía entre 100 m y 1000 m, pero pese a esta gran variabilidad hay que indicar que está extendido por toda la FPI (Rosa et al., 2010).

La acumulación de materiales volcánicos se produjo en varios ciclos efusivos, pero se discute sobre su número y equivalencia entre diversas zonas. A pesar de su gran heterogeneidad, en sentido vertical, y de sus grandes variaciones en el lateral, se ha establecido una columna sintética a escala regional. Este modelo litoestratigráfico, establecido en los años 1980-1990, esencialmente a partir de las observaciones realizadas en la región de Pomarao (Portugal) y en el anticlinorio de Puebla de Guzmán (Strauss y Madel, 1984), fundamenta la diferenciación, en el CVS, de tres ciclos volcánicos ácidos:

- Primer vulcanismo ácido inicial o V1, al cual se asocia la mayoría de las mineralizaciones de sulfuros masivos. Contiene tramos de rocas volcánicas ácidas (riolitas a dacitas, localmente rocas andesíticas), rocas sedimentarias y epiclásticas y, ocasionalmente, de rocas básicas.
- Segundo vulcanismo ácido V2 (intermedio, también denominado Fm Mangesífera), al cual se asocian las mineralizaciones vulcanogénicas de manganeso. En conjunto, es de carácter más piroclástico que el anterior e incluye una mayor presencia de materiales sedimentarios que aquél. Puede incluir también rocas volcánicas básicas e importantes pasadas de rocas sedimentarias y epiclásticas. Contiene, en sus tramos superiores, niveles de cherts y de jaspes. A techo, aparece un estrecho nivel de pizarras o cineritas moradas que constituye el único nivel guía válido en la mayor parte de la FPI.

- Tercer vulcanismo ácido o vulcanismo final, formado mayoritariamente por rocas piroclásticas, sedimentarias y epiclásticas. A techo pasa a pizarras negras que constituyen la serie basal del flysch de las facies Culm.

Los yacimientos principales se localizan exclusivamente en el Complejo Vulcanosedimentario (Figura 1.4) y, desde el punto de vista mineralógico, son de dos tipos: sulfuros masivos y de minerales de manganeso. Además, existen numerosas mineralizaciones filonianas de Cu, Pb, Zn, Sb, barita, etc. de poco interés económico.

Los depósitos de sulfuros masivos están constituidos presencialmente por pirita con contenidos que pueden llegar a ser importantes de calcopirita, galena y esfalerita, englobados en una matriz pirítica; en este caso recibe la denominación de pirita compleja o sulfuro polimetálico. Estos yacimientos, en general, son estratiformes, con morfología lenticular de dimensiones variables. Los procesos de meteorización han desarrollado en las masas de sulfuros aflorantes monteras de oxidación (gossan), constituidas por goethita, limonita y pequeñas cantidades de metales preciosos.

Los yacimientos de manganeso están relacionados genéticamente con las facies de pizarras moradas, tobas finas y jaspes rojos (VA-2). La mineralización primaria consiste en una masa de carbonatos y silicatos de manganeso, cuya alteración superficial ha ocasionado un enriquecimiento secundario de manganeso en forma de óxidos e hidróxidos amorfos (pirolusita y psilomelano) que han sido objetos de las explotaciones.

1.7. Encuadre histórico de la minería del manganeso en Huelva

Pinedo Vara (1963) recoge en su obra “Piratas de Huelva. Su historia, minería y aprovechamiento” datos que por su interés se reproducen en esta tesis. La minería del manganeso en la Faja Pirítica Ibérica se inicia en la mitad del Siglo XIX, en los términos municipales de Villanueva de los Castillejos y Alosno (Huelva). Esta minería, destinaba su producción a fábricas de productos químicos en Francia, y a industrias de tejidos situadas en Inglaterra, Alemania y Estados Unidos. A partir de 1878, se comienza a destinar el manganeso extraído a la industria del acero.

Aproximadamente, en el entorno de Huelva, en la segunda mitad del siglo XIX se extrajeron unas 440.000 Tm de manganeso, con una media de 17.600 Tm anuales de, fundamentalmente, óxidos de manganeso, ya que los carbonatos y

silicatos se arrojaban a escombreras, hasta que la industria siderúrgica comenzó a demandar los carbonatos.

La provincia de Huelva, y por tanto España, era hacia 1880 el primer país en producción de manganeso, proporcionando en 1881 alrededor del 66% del consumo mundial, para pasar posteriormente a producciones más modestas al descubrirse los grandes criaderos actuales de Cáucaso, América, Nueva Zelanda o India.

A partir de los años finales del siglo XIX e inicio del XX, las producciones continuaron siendo importantes, de forma que hasta 1960, se produjeron en la provincia de Huelva unas 2.400.000 Tm de mineral de manganeso.

En cuanto a calidades, se estima que alrededor del millón de toneladas habrán sido de óxidos y peróxidos, con escasa sílice y con leyes medias por encima del 40% en manganeso, producidos especialmente durante el siglo XIX.

La etapa de la primera guerra mundial y años que siguieron hasta su finalización en 1918, tuvo lugar en la Faja una especial presión extractiva sobre silicatos destinados a la elaboración de silicomanganesos en países de Centro Europa.

En 1941, la explotación experimentó un nuevo auge, y se arrancaron minerales de buena calidad en varias minas que frecuentemente se mezclaban en las minas o en las factorías nacionales de ferroaleaciones con otros minerales de escombreras antiguas, muy bajos en manganeso y altos en sílice.

Las zonas de mayores criaderos de manganeso de la Faja Pirítica onubense fueron las localizadas en los términos municipales onubenses de Calañas y El Cerro del Andévalo, y en ellos, las minas no fueron explotadas con racionalidad. Los explotadores del manganeso, eran personas generalmente humildes, obreros de otras minas y corporaciones mineras en algunos casos, que contaban con más voluntad y conocimiento de los minerales que con medios materiales para mecanizar el arranque, extracción, etc. Tuvieron, además, más valor para meterse entre las peligrosas ruinas antiguas que para comprometerse en créditos bancarios o para aprovechar las facilidades económicas que en algunas épocas se pudieron conseguir del Consejo Ordenador de Minerales Especiales de Interés Militar.

El Consejo Ordenador, creado en 1941 y con actividad hasta 1959, tenía como misión adquirir todos los minerales de manganeso y distribuirlos entre las factorías de ferroaleaciones, en una actividad semejante a la llevada a cabo por el Servicio Nacional del Trigo entre los agricultores cerealistas y las fábricas de harina. De ahí la proliferación de las anteriormente comentadas actividades

extractivas individualistas de los mineros y obreros del entorno, que encontraban una salida segura al mineral obtenido por sus propios medios.

El declive de la minería manganesífera, llega con el escaso impulso por parte de los gobiernos a este tipo de actividad, debido en primer lugar a las ventajas económicas que la política general ofrecía a los importadores, y en segundo lugar, por el escaso favoritismo dedicado, en comparación, al sector minero con respecto a otros sectores, teniendo en cuenta el riesgo que suponía para empresarios y obreros.

1.8. *Las minas de manganeso de Huelva*

En la provincia de Huelva pueden encontrarse muchos centenares de criaderos manganesíferos en toda la extensión de la zona pirítica (Pinedo Vara, 1963). Estos suelen presentarse al exterior con los típicos jaspes, rocas muy duras, que aparecen sobresaliendo entre las pizarras en las laderas y crestas de los montes. Tienen corridas generalmente muy largas y potencias también variables entre varios centímetros y unas decenas de metros. La coloración de los jaspes varía entre morada y roja, presentando a veces intercalaciones muy vistosas de cuarzo blanco o de minerales de manganeso e, incluso, pintas de pirita.



Figura 1.5. Crestones de jaspe en las inmediaciones de Soloviejo.

Los criaderos de manganeso tienen una corrida de dirección aproximada O 20° N, como los de pirita. En cuanto a sus formas y mineralizaciones, caben todas las variedades, presentándose los óxidos en las zonas altas en forma de delgadas

vetas o rellenando geodas entre jaspes e incluso en forma térrea, sin jaspe en sus proximidades. El mineral limpio se presenta principalmente en pequeñas o grandes bolsadas, que suelen ser mayores cuando dicho mineral lo constituyen los silicatos o carbonatos que se dan en las zonas más profundas.

Se observa, a veces, en las galerías, donde se cruzan los filones de jaspe, unas zonas algo descompuestas, por las que frecuentemente discurre el agua o humedad excesiva, que los mineros llaman “flojeras”, las cuales suelen conducir a las bolsadas de mineral explotable.



Figura 1.6. Afloramiento de jaspe en el Cerro de Cobullos.

Estos yacimientos están constituidos por silicatos (rodonita) y carbonatos (rodocrosita) como minerales primarios, produciéndose en la montera óxidos y peróxidos secundarios (pirolusita, psilomelano, wad), que son zonas de enriquecimiento supergénico. La mineralización se presenta en forma de bolsadas. Corresponden a las últimas fases de los episodios volcánicos, situándose a techo de las masas sulfurosas y asociados a emanaciones silíceas póstumas. Poseen la misma dirección regional E-O de los sulfuros (Pinedo Vara, 1963).

Han sido muchas las labores efectuadas en la zona (Soloviejo, Pepito, Cobullos, Dos Amigos-Covadonga, Romerita-Pinpollar, la Africana, Maicoja, La Vieja, Santa Bárbara, Puerta Alegre, Peña del Aguila, etc.) algunas muy importantes y de las que fueron trabajadas principalmente las partes superiores de los depósitos (óxidos y peróxidos) y extraídos silicatos y carbonatos de los inferiores. La explotación se hizo, salvo en las minas importantes, por métodos rudimentarios,

sin ninguna mecanización y siguiendo generalmente un método selectivo, por lo que el mineral más íntimamente mezclado con SiO₂ se abandonó. Nunca se llevó a cabo una prospección sistemática que permitiera un reconocimiento y cubicación adecuada.

Aún se encuentran muchos afloramientos de jaspe en la provincia totalmente intactos y otros que solo han sido trabajados en los primeros metros, en labores poco formalizadas, siguiendo los filoncillos de peróxido que, además de presentarse a veces blancos, alcanza altos precios o se presta a pequeñas labores individuales, de poca magnitud. Los yacimientos más potentes, los más próximos o mejor comunicados con los pueblos o los que a poca profundidad dieron potencias mineralizadas de interés son los únicos que han dado lugar a explotaciones industriales.

En lo que respecta al objetivo de la tesis, como en cualquier ámbito de la naturaleza, se consideró que la mayor probabilidad de encontrar un microorganismo capaz de oxidar un mineral sería allí donde exista una mayor concentración de ese mineral. De esta forma, se decidió acudir a entornos muy ricos en manganeso donde la actividad humana fuera mínima y permitiera el desarrollo de comunidades microbianas que intervienen en el ciclo biogeoquímico de este elemento.

Como ecosistemas idóneos se consideraron las minas de manganeso explotadas durante el siglo XIX en el entorno de la FPI. Son lugares donde durante años se aprovecharon de forma más o menos industrializada los filones de manganeso, y que desde los años 1950-1960 fueron cesando su actividad debido a la caída de los precios del manganeso y el aumento de los costes de explotación para ya no volver a explotarse.

De esta forma, se seleccionaron explotaciones abandonadas en la FPI que por su importancia y conocimiento de las galerías, se consideraron aptas para la investigación.

Pinedo Vara (1963) en su obra "Piritas de Huelva. Su historia, minería y aprovechamiento", recoge algunas de las explotaciones de manganeso más conocidas de la Faja Pirítica Ibérica.

De todas las explotaciones incluidas en la Tabla 1.2, las que han resultado más interesantes para la elaboración de la presente Tesis Doctoral fueron las minas Pepito (Nerva), Cobullos (Campofrío), y Poderosa (El Campillo). Además se incluyó Soloviejo (Almonaster La Real), San Platón (Almonaster La Real) y La Peña del Hierro (Nerva).

Tabla 1.2. Explotaciones de manganeso más conocidas de la Faja Pirítica Ibérica.

Denominación	Término Municipal	Denominación	Término Municipal
Santa Catalina	El Granado	Clemente Isidro	Calañas
Conde	El Granado	Pancho-Santiago	Calañas
Resurgida	Paymogo	Florentina o Sierpe	Calañas
La Isabel	El Almendro	La Tallisca	Calañas
San Sebastián	El Almendro	Adolfina	Calañas
Gonzala o Gozala	Villanueva de los Castillejos	Calañesa	Calañas
El Toro	Puebla de Guzmán	Santa Marina	Calañas
Virgen María	Alosno	El Cuervo o Preciosa	Valverde del Camino
N. Sra. del Pilar	Alosno	Los Mellizos	Valverde del Camino
El Chaparral	Alosno	Guadiana	Zalamea La Real
San Francisco	Alosno	Posterera	Zalamea La Real
Herculano	El Cerro del Andévalo	Palanco	Zalamea La Real
Soberana	El Cerro del Andévalo	Oriente	Zalamea La Real
Los Dos, de El Cerro	El Cerro del Andévalo	Aurora	Zalamea La Real
Cicerón	El Cerro del Andévalo	Casualidad	Almonaster La Real
San Joaquín	El Cerro del Andévalo	Romerita-Pimpollar	Almonaster La Real
Mina El Morante	Calañas	Grupo Soloviejo	Almonaster La Real
Salvadora	Calañas	Santa Bárbara	Almonaster La Real
Sanatorio	Calañas	Poderosa	El Campillo
España	Calañas	Rocío	Almonaster La Real
Catalina	Calañas	Emilia	Almonaster La Real
Santa María	Calañas	Santa Eulalia	Almonaster La Real
Los Dos	Calañas	Pepito	Nerva
La Rodrigada	Calañas	Grupo Cobullos	Campofrío-El Campillo
Piedras Albas	Calañas	Dos Amigos-Covadonga	Campofrío
El Gato	Calañas	El Higueral	El Castillo de las Guardas

1.9. El manganeso en microorganismos

La mayor parte o la totalidad de los organismos probablemente poseen manganeso en sus sistemas de transporte, algunos de los cuales han sido caracterizados en bacterias, levaduras y animales (Hutner 1972; Bhattacharyya 1975). De hecho, el manganeso es un elemento esencial en cantidades traza en virtualmente todos los organismos vivos. Algunas de las participaciones específicas del manganeso en sistemas enzimáticos son conocidas, pero en la mayoría de los casos, el magnesio u otros cationes divalentes pueden sustituir al manganeso (Hutner 1972; Mandelstam y McQuillem, 1973; Gottschalk 1986).

Algunas enzimas como la superóxido dismutasa requieren manganeso, así como las enzimas de las primeras etapas de la biosíntesis de ácidos grasos. El manganeso es necesario en la fase temprana de formación de esporas en el género *Bacillus*, y para la síntesis de pentapéptidos en las paredes celulares de algunas bacterias. Las reacciones que implican polimerización de ARN son aceleradas por el manganeso, así como la participación de la captura de proteínas por el manganeso en el fotosistema II, a través de cambios de valencia en la reacción de fotoactivación que resulta en la liberación de oxígeno (Radmer y Kok 1975).

Muchos organismos oxidan o reducen relativamente altas cantidades de manganeso sin asimilarlo. Tales procesos tienen particular importancia en el ciclo del manganeso. De estas transformaciones, las más y mejor estudiadas son las que se refieren a procesos bacterianos, aunque también se ha descrito los relacionados con hongos y algas (Krumbein 1971).

La oxidación-reducción biológica del manganeso puede ser tanto directa como indirecta. Gran parte de la actividad biológica altera el potencial redox (Eh) o el pH del ambiente y posibilita indirectamente los cambios de valencia. Los precipitados o formaciones de manganeso, producidas indirectamente, no están necesariamente vinculadas a la célula, pudiendo ocurrir a considerables distancias de estas, según Marshall (1979). Tales efectos indirectos pueden ser de gran importancia en la naturaleza, especialmente con relación a la reducción del manganeso, lo cual sucede espontáneamente en condiciones de bajo potencial redox o bajo pH. El establecimiento de zonas anaeróbicas por medio del consumo de oxígeno por acción microbiana y producción de ácidos y sulfuros puede movilizar grandes cantidades de manganeso.

Los efectos directos que son atribuibles a organismos vivos usualmente conllevan la producción de proteínas, carbohidratos u otros materiales que pueden capturar, concentrar, y por tanto posibilitar la oxidación del manganeso. Incluso en estudios

de laboratorio, sin embargo, no siempre es fácil diferenciar los efectos directos de los indirectos. Cuando la oxidación de manganeso ocurre mucho más rápido de lo que sería predecible por consideraciones termodinámicas (concentraciones de productos y reactivos, potencial rédox y pH) y cuando los microorganismos se encuentran presentes se sospecha un efecto directo.

Las bacterias tienen una demostrada capacidad de oxidar el manganeso, ampliamente recogida en la literatura por diversos autores (Greene y Madgwick, 1991; Mandernack et al. 1995; Villalobos et al. 2003; Tebo et al. 2005, 2010; Jiang et al. 2010; Spiro et al. 2010; Sujith y Bharathi, 2011). La oxidación biogénica del manganeso por bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* ha sido tratada con profundidad por esos autores (Tabla 1.3). Carmichael y Bräuer (2015) contabilizaron 75 géneros de bacterias implicados en la oxidación del manganeso. En resumen, la capacidad de oxidar Mn(II) a Mn(III) o Mn(IV) ha sido descrita en diversos grupos de bacterias (Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes) y en diversos ambientes, particularmente el acuático, donde se han encontrado nódulos de ferromanganeso en las profundidades de los océanos.

El papel fisiológico que en las bacterias cumple la oxidación del manganeso no está claro. Se cree que al ser la oxidación del Mn(II) un proceso energéticamente favorable, es posible que algunas bacterias puedan obtener energía, o que intervenga en incrementar la disponibilidad del carbono orgánico, ya que es capaz de degradar la materia orgánica. Asimismo se sospecha que el que las bacterias se rodeen de una vaina de óxidos de manganeso pudiera ser una vía para protegerse de los compuestos tóxicos del ambiente (Tebo et al. 2005).

La ruta metabólica de la oxidación del manganeso es bien conocida. Esta ocurre en presencia de oxígeno según la reacción:



Tebo et al. (2010) considera que la reacción enzimática procede en dos etapas: oxidación of Mn(II) a Mn(III) y Mn(III) a Mn(IV) (Figura 1.7). En presencia de ligandos orgánicos o inorgánicos (L), el Mn(III) intermediario puede formar un complejo soluble Mn(III)–L, que puede ser estable en solución o sufrir oxidación o desproporción a óxidos Mn(IV). En condiciones de bajo contenido en hierro, algunas bacterias oxidantes del Mn(II) y muchas bacterias no oxidantes del Mn(II) pueden producir ligandos orgánicos que promueven abióticamente la oxidación del Mn(II) a Mn(III)-L. Sin embargo, esto es difícil de demostrar

experimentalmente debido a que el Mn(III) soluble es inestable y no se acumula en concentraciones detectables. Entre los ligandos conocidos que complejan y estabilizan el Mn(III) en solución están el pirofosfato o los sideróforos.

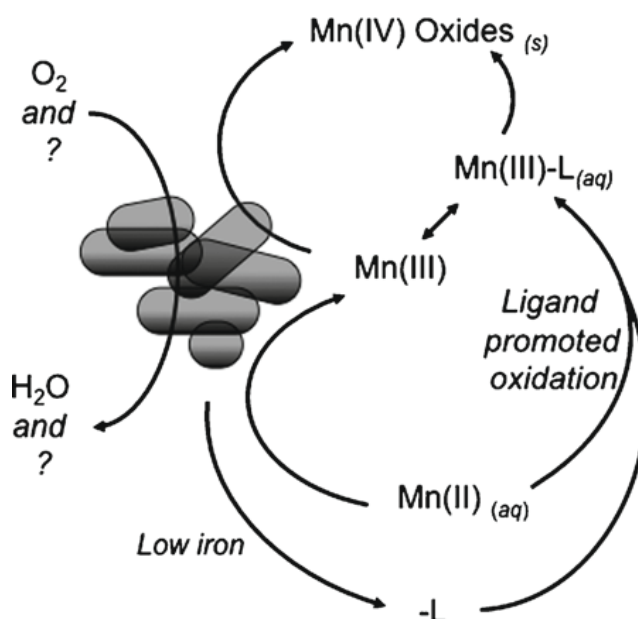


Figura 1.7. Oxidación biogénica del manganeso según Tebo et al. (2010).

Las enzimas que intervienen en la reacción son las multicobre oxidasas (MCO) que se caracterizan por tener cobre como cofactor. Su intervención en el proceso de oxidación sólo ha podido ser demostrada en la cepa de *Bacillus* sp. SG-1, pero no en otras bacterias como *Pseudomonas putida* MnB1, GB1, *Leptothrix discophora* SS1, o *Pedomicrobium* sp. ACM3067 (Sujith y Bharathi, 2011).

La oxidación por hongos es menos conocida, por lo que es el objeto de esta tesis. En efecto, solo unos pocos autores han investigado el papel de los hongos en el ciclo del manganeso (Tabla 1.4).

Los datos confirmados hasta hoy indican que los hongos pueden tanto oxidar el manganeso como solubilizarlo a partir de óxidos de manganeso (Mohanty et al., 2017). En este último aspecto, se ha demostrado la efectiva solubilización de MnO_2 por hongos del género *Aspergillus* (*A. terreus*, *A. oryzae*) y *Penicillium* (*P. daleae* y tres *Penicillium* spp.).

Tabla 1.3. Algunas bacterias descritas en la literatura como oxidantes del manganeso.

Géneros de bacterias representativos	Referencias
<i>Pedomicrobium</i>	2, 7, 8
<i>Ralstonia</i>	7, 8
<i>Variovorax</i>	7, 8
<i>Albidiferax</i>	8
<i>Citrobacter</i>	8
<i>Flavobacterium</i>	1, 7, 8
<i>Erythrobacter</i>	4, 7, 8
<i>Roseobacter</i>	7, 8
<i>Bacillus</i>	1, 4, 7
<i>Marinobacter</i>	7, 8
<i>Pseudoalteromonas</i>	7, 8
<i>Alteromonas</i>	7, 8
<i>Agrobacterium</i>	1
<i>Arthrobacter</i>	4, 7
<i>Oceanospirillum</i>	4, 7
<i>Hyphomicrobium</i>	4, 7
<i>Acinetobacter</i>	5, 6
<i>Janthinobacterium</i>	6, 7
<i>Agromyces</i>	7
<i>Cellulomonas</i>	7
<i>Pseudomonas</i>	1, 7
<i>Microbacterium</i>	7
<i>Geodermatophilus</i>	7
<i>Micrococcus</i>	7
<i>Pseudonocardia</i>	7
<i>Nocardia</i>	7
<i>Streptomyces</i>	7
<i>Rhodococcus</i>	7
<i>Propionibacterium</i>	7
<i>Corynebacterium</i>	7
Especies representativas	
<i>Leptothrix discophora</i>	2
<i>Sphaerotilus discophorus</i>	4
<i>Aurantimonas manganoxydans</i>	3, 4
<i>Pseudomonas putida</i>	2
<i>Escherichia coli</i>	8

(1): Santelli et al. (2010), (2): Spiro et al. (2010), (3): Tebo et al. (2010), (4): Sujith y Bharathi (2011), (5): Beukes y Schmidt (2012), (6): Carmichael et al. (2013), (7): Carmichael y Bräuer (2015), (8): Hansel (2017).

Tabla 1.4. Hongos descritos en la literatura como oxidantes del manganeso.

Hongos	Referencias
<i>Acremonium nepalense</i>	5
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	3, 4
<i>Stilbella aciculosa</i>	3
<i>Acremonium strictum</i>	3, 4
<i>Microdochium bolleyi</i>	3
<i>Pyrenochaeta</i> sp.	3, 4
<i>Stagonospora</i> sp.	3, 4
<i>Alternaria alternata</i>	3
<i>Pithomyces chartarum</i>	3
<i>Phoma</i> sp.	2, 3
<i>Acremonium</i> sp.	1
<i>Paraphaeosphaeria</i> sp.	1

(1): Miyata et al. (2006), (2): Sasaki et al. (2008), (3): Santelli et al. (2010), (4): Santelli et al. (2011), (5): Saiz-Jimenez et al. (2012).

Mohanty et al. (2017) consideraron que la solubilización de MnO_2 se debió a la producción de ácidos orgánicos, tales como los ácidos oxálico, cítrico, maléico y glucónico, como se reveló por cromatografía iónica. Para su estudio estos autores recogieron muestras de escombreras de minas de manganeso en la India, de donde aislaron hongos capaces de solubilizar MnO_2 en placas de Petri, proceso observable por la formación de una zona de solubilización alrededor del micelio. También Wei et al. (2012) demostraron la capacidad de *Aspergillus niger* y *Serpula himantioides* para solubilizar óxidos de manganeso. En este caso, se detectó la formación de oxalato de manganeso trihidrato por *S. himantioides* a partir de birnesita, que posteriormente se transformó en oxalato de manganeso dihidrato.

Para Santelli et al. (2011) la oxidación del Mn(II) a Mn(III, IV) por hongos puede ser igual o más importante que la de bacterias. Algunos autores (Miyata et al. 2006; Saratovsly et al., 2009) han identificado birnesita y todorokita como productos de la oxidación de una serie de hongos (*Plectosphaerella cucumerina*, *Pyrenochaeta* sp., *Stagonospora* sp. y *Acremonium strictum*). En la cueva de Lascaux, de donde se aisló el hongo *Acremonium nepalense*, se demostró que este oxidaba el manganeso, tanto en el medio natural, como en el laboratorio (Saiz-Jimenez et al., 2012).

1.10. Objetivos de la tesis

Los objetivos de la presente Tesis Doctoral son profundizar en el conocimiento de los óxidos de manganeso biogénicos producidos por hongos presentes en el ambiente. Estos incluyen:

- Aislamiento e identificación de las especies de hongos presentes en áreas mineras con capacidad de oxidación manganeso.
- Descripción de la capacidad de oxidación de manganeso en especies de hongos, no conocidas anteriormente.
- Caracterización y estudio de los óxidos de manganeso producidos por la actividad microbiana mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.
- Comparación de los óxidos de manganeso biogénicos con los óxidos de manganeso de síntesis producidos in vitro.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Localización del área de muestreo

Se ha considerado que para encontrar cepas fúngicas con la capacidad de oxidar manganeso, se debería acudir a zonas naturales en las que la presencia de manganeso sea importante. Teniendo en cuenta la escasez de este mineral, se optó por acudir a antiguas explotaciones mineras.

Entre las principales áreas metalogénicas del mundo se encuentra la Faja Pirítica Ibérica (FPI), entre las provincias de Huelva y Sevilla, donde durante cientos de años, de forma ininterrumpida, se han explotado filones con diversos intereses económicos a lo largo de toda su geografía. En esta zona, se agrupan explotaciones mineras de cobre, hierro, plomo, zinc y, entre otros, manganeso.

El manganeso en la FPI, ha sido tradicionalmente una de las sustancias protagonistas en el aprovechamiento minero, sucediéndose las explotaciones a lo largo de la Faja.

Actualmente, existen localizadas un total de unas 300 antiguas minas y registros mineros relacionados con el manganeso en la FPI (según investigaciones del Prof. Dr. D. Emilio Manuel Romero Macías, ETSI, Universidad de Huelva). Entre estos, se encuentran simples socavones o registros donde los mineros, a título individual, se adentraban en sinuosas galerías de escasa profundidad para extraer el manganeso, o auténticas minas como Soloviejo y la Joya de Almonaster, desde donde se extrajeron unas 80.300 toneladas de manganeso entre los años 40-60 del siglo XX, constituyéndose en la principales minas de manganeso de la Península Ibérica.

De esta forma, y analizando la bibliografía de estas antiguas explotaciones y el acceso a las mismas, se seleccionaron varias minas para proceder a su muestreo: Mina Pepito (Nerva, Huelva), Mina Cobullos (Campofrío, Huelva), Mina La Poderosa (El Campillo, Huelva), Minas de Soloviejo (Almonaster La Real, Huelva), Mina San Platón (Almonaster La Real, Huelva), Arroyo Mina de la Peña del Hierro (Nerva, Huelva), Mina Concepción (Almonaster La Real, Huelva).

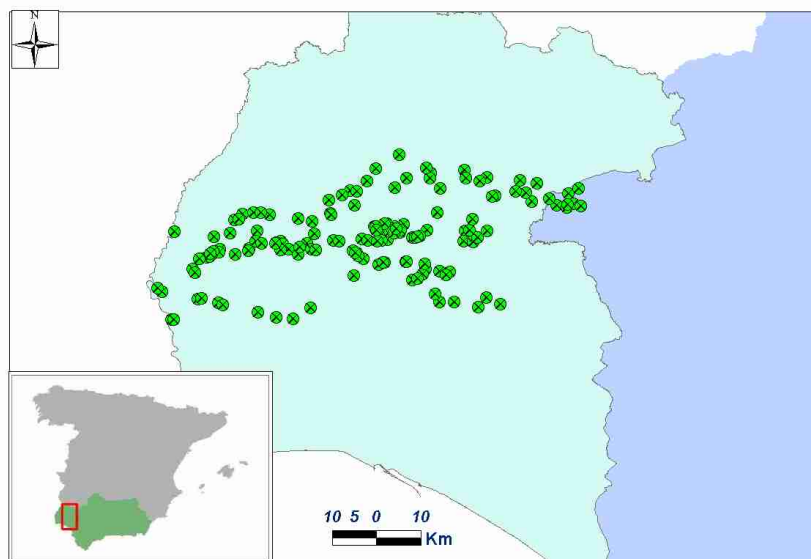


Figura 2.1. Localización de minas y registros mineros de manganeso. Elaboración propia a partir de información proporcionada por el Dr. D. Emilio Manuel Romero Macías, Universidad de Huelva. Año 2012.



Figura 2.2. Localización de las minas muestreadas. Elaboración propia, 2017.

2.1.1. Mina Pepito (Nerva, Huelva)

Localización: Coordenadas ETRS89 H29: X= 716.551, Y = 4.177.549.

Está situada en el paraje denominado *Tejonera*, Término Municipal de Nerva (Huelva).

El acceso se lleva a cabo a partir del Núcleo Urbano de Nerva, desde donde se debe tomar al Norte la Carretera HU-6105 (Nerva a La Granada de Río Tinto) con dirección “La Granada”, donde a unos 3 km, surge un camino al Este, por el cual se deben recorrer unos 700 metros.

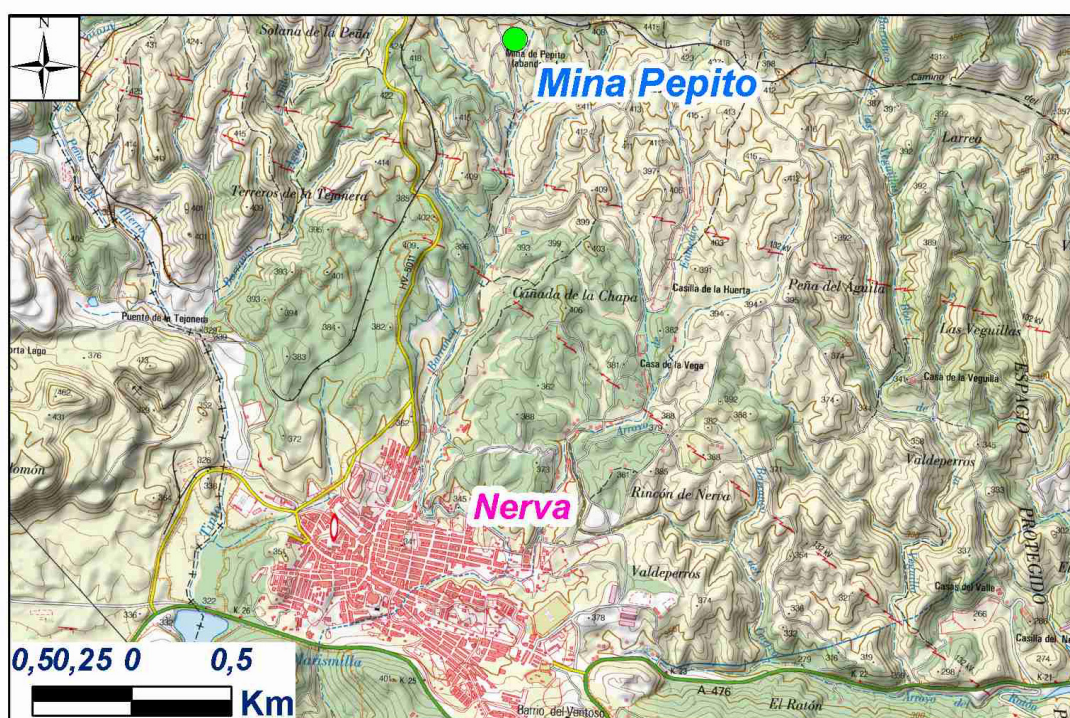


Figura 2.3. Situación de la Mina Pepito. Elaboración propia, 2017.

El filón corre aproximadamente de Este a Oeste, buza al Norte y apenas si presenta afloramientos de jaspe. Bajo una estrecha faja de óxidos, apareció la masa de carbonato que la razón social “Antonio Domínguez Roldán” explotó en última instancia.

El pozo de extracción mide 120 metros y desde el mismo se hicieron las traviesas de arrastre. Las plantas 1, 2 y 3 correspondieron a zona de óxidos y de la 4 a la 12 se explotaron los carbonatos. La potencia del filón ha sido variable, siendo la media de la 4 y la 5 de unos 9 metros, que se elevó a unos 20 entre la 6 y la 12, apareciendo en esta última un caballón de estéril que, para bien o para mal, ha de influir en las mineralizaciones más profundas.



Figura 2.4. Ortofotografía digital aérea del emplazamiento de la Mina Pepito. Año 2013.

Las mineralizaciones no se cerraban en corrida, siendo probable que siguiéndolas desde varios pisos apareciera alguna otra bolsada semejante a la actual, que ha sido de las más regular entre las conocidas en esta provincia y, también de las mejor metalizadas, pues prácticamente no se producía estéril.



Figura 2.5. Bocamina de las antiguas galerías en Mina Pepito. Año 2012.

Los minerales han sido de buena calidad, produciendo generalmente dos tipos, uno del 28 al 30 % de manganeso, y otro del 36 al 42%, con mayor proporción del último. La mayoría del carbonato se ha calcinado. La mina Pepito se explotó sin interrupción desde el año 1947. Las partidas embarcadas por el Consejo Ordenador totalizaron una media de 4.170 Tm al año, con leyes medias de 34,4% de manganeso y 25,1% de SiO_2 .



Figura 2.6. Instalaciones de la Mina Pepito. Ruinas de hornos de calcinación de carbonatos. Año 2012.



Figura 2.7. Escombrera con restos de mineral de manganeso. Mina Pepito. Año 2012.

2.1.2. Mina Cobullos (Campofrío, Huelva)

Localización: Coordenadas ETRS89 H29: X= 707.751, Y = 4.181.150.

Situada en el Paraje *Cerro de Cobullos*, en el Término Municipal de Campofrío (Huelva).

Se alcanza esta mina tomando la carretera A-461 (Santa Olalla del Cala a Zalamea La Real) partiendo desde Minas de Río Tinto y destino Campofrío. En el p.k. 43, tras atravesar el Embalse del Gossam de las instalaciones mineras de Río Tinto, se toma al Oeste un camino por el que hay que transitar 5,5 km, hasta que encontramos una bifurcación que tomamos a la derecha. Enseguida se encuentra una valla de la finca privada donde se encuentran la bocamina y diversas galerías de la explotación.



Figura 2.8. Situación de la Mina Cobullos. Elaboración propia, 2017.

Comprende seis concesiones del titular Don Antonio Domínguez Roldán, enclavadas en los términos de Campofrío y El Campillo, por las que corren indicaciones manganesíferas en una longitud de unos 3.000 metros.

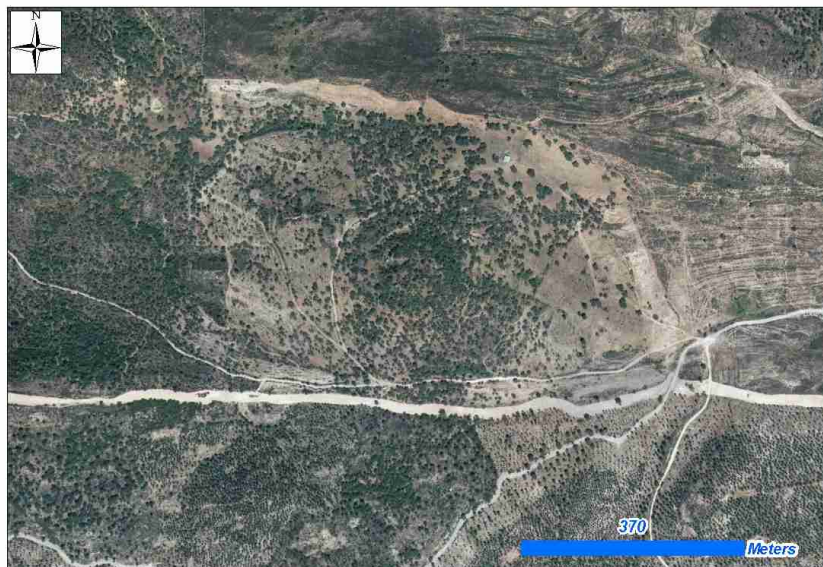


Figura 2.9. Ortofotografía digital aérea del emplazamiento de la Mina Cobullos. Año 2013.

Hasta hace poco, estuvo totalmente incomunicada esta mina, hoy visitable a través de una pista de unos 4 kilómetros.

En la zona más a Levante se encuentra la antigua concesión San Nicolás, con dos frentes preparados para el arranque, uno de 3 a 4 metros de potencia en silicato y otro, a unos 14 metros de profundidad, en carbonato. En la zona Poniente está la concesión María del Pilar, por la que corren los afloramientos de jaspes, sobre los cuales sólo se han abierto unas calicatas, de las que se obtuvieron algunos peróxidos.

La zona más importante es seguramente la de Cobullos, cuyo majestuoso afloramiento de jaspes se divisa desde muchos kilómetros de distancia. Esta zona ha sido explotada durante muchos años por un sistema cómodo pero irracional, al dejar a los obreros con relativa libertad de movimientos, abonándoles a un determinado precio la producción semanal. Por lo que aquello parece una inmensa ratonera con vericuetos por doquier.

En los últimos años de su explotación se iniciaron labores de investigación que por las dificultades de mercado no se continuaron; en el piso 5º quedaron unos frentes de carbonato; en el pozo La Casa quedaron peróxidos a la vista y en el pozo Fragua quedó una galería en carbonato.



Figura 2.10. Panorámica del Cerro de Cobullos.



Figura 2.11. Acceso a galería en Mina Cobullos.

Cobullos produjo fuertes tonelajes de peróxidos, y aunque no se hizo ningún intento serio de explotación, se embarcaron con destino a ferroaleaciones entre 1952 y 1960 unas 1.100 Tm, con leyes entre el 34,03% y 40,16% manganeso y 18,30% al 31,61% de SiO_2 .



Figura 2.12. Afloramiento de jaspes en Mina Cobullos.



Figura 2.13. Mineral en el interior de las galerías en Mina Cobullos.

2.1.3. Mina La Poderosa (El Campillo, Huelva).

Localización: Coordenadas ETRS89 H29: X= 706.593, Y = 4.180.337.

Situada en el paraje *El Pimpollo*, su acceso se realiza desde Minas de Río Tinto, donde hay que tomar la Carretera A-461 (Santa Olalla del Cala a Zalamea La Real) dirección Norte. A la altura del kilómetro 43, se toma un camino a la

izquierda, en el cual se recorren 6.800 metros dirección Oeste. Tras recorrer esta vía, con gran cantidad de curvas pero en buen estado, encontramos directamente la Mina (parte de arriba de la explotación), o bien continuamos por el camino 200 metros adicionales para acceder a la zona de la boca mina de interior.

Se encuentra en el Término Municipal de El Campillo, en un macizo montañoso y mal comunicado por el que abundan manifestaciones ferruginosas, jaspes y filones de cuarzo. Inmediatas a Poderosa se encuentran las minas de *San Eduardo* y *San Platón*, de pirita, y *Cobullos*, *Buitrera* y *Dos Amigos*, de manganeso. Esta mina fue conocida y trabajada por Tartessos y romanos, que han dejado en sus proximidades algunos montones de escorias sobre las que crecen arbustos y alguna que otra encina. Siguieron después varios siglos de inactividad hasta mediados del XIX, sin más noticias sobre ella que la referente a una solicitud de explotación ya en época moderna, año 1635.

Al iniciarse la segunda mitad del siglo XIX fue puesta en explotación por los señores Santaló de Sevilla, que arrancaron minerales por huecos y pilares para beneficiarlos por calcinación al aire libre; restos de este periodo son la mayor parte de morrongos que hoy se encuentran extendidos en las inmediaciones de la mina, no explotados aún por las dificultades que presenta su salida por carretera o ferrocarril.

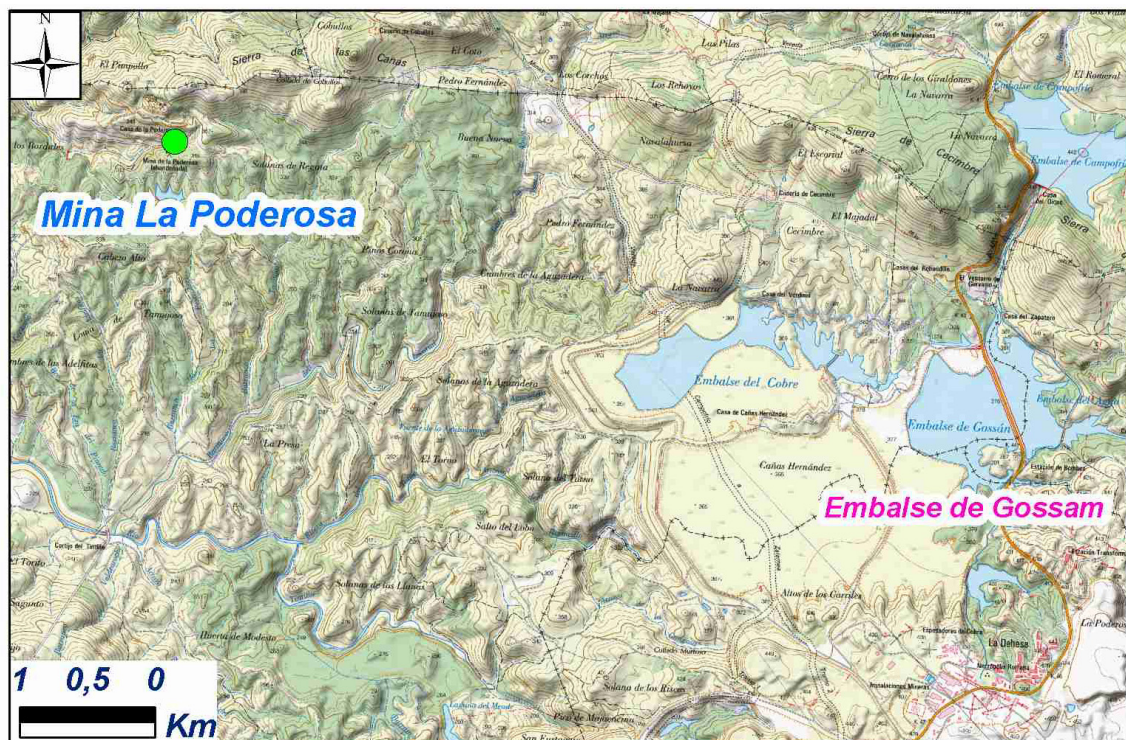


Figura 2.14. Situación de la Mina La Poderosa. Elaboración propia, 2017.

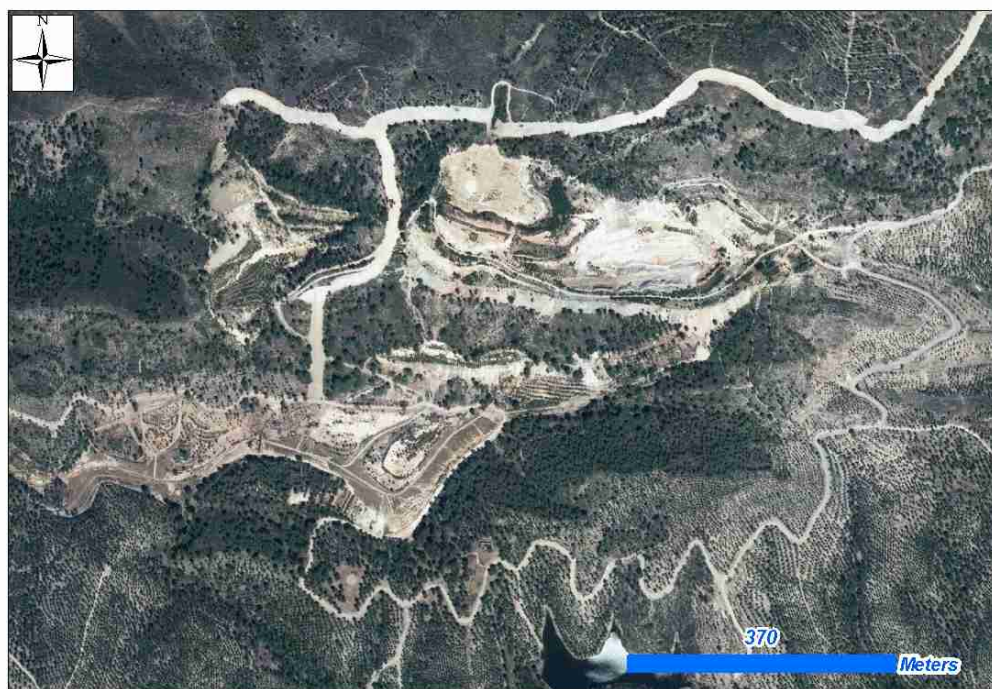


Figura 2.15. Ortofotografía digital aérea del emplazamiento de la Mina Poderosa. Año 2013.

En 1874 adquirió esta mina la casa James Hit and Company, que la explotó a cielo abierto derramando sobre su ladera los extensos vacies de óxidos de hierro procedentes de la montera que cubría la pirita, la cual alcanzó espesores entre 210 y 60 metros. Estos vacies llaman poderosamente la atención cuando se ven a lo lejos y, en especial, desde la carretera de San Juan del Puerto a Cáceres.

Pasó después Poderosa a formar grupo minero con la Concepción, bajo los sucesivos auspicios de la Alkali Company y de la Compañía del Buitrón, hasta que fue adquirida a finales de los años 50 por el señor Ribera, de Barcelona, y arrendada a Electrólisis del Cobre, S.A.

Se han explotado aquí dos filones principales, San Bernardo y San Valentín, y algunas mineralizaciones independientes que apenas alcanzaron extensión. El San Bernardo, que es el de mayor potencia, se explotó en parte a cielo abierto con arranque por voladura, a pesar de su relativa estrechez y fuerte espesor de montera, y, después, por contramina hasta los 250 metros de profundidad (galerías hoy inundadas). Tuvo una corrida explotable de unos 175 metros y potencias variables entre 2 y 10, con 7 de término medio.



Figura 2.16. Zona alta con aprovechamiento a cielo abierto. Mina Poderosa.



Figura 2.17. Corta a cielo abierto, Mina Poderosa.



Figura 2.18. Bocamina de entrada a interior. Mina Poderosa.

En el año 1923, al pensar parar definitivamente, se hizo un tapamiento en el nivel 266 con el fin de inundar la mina hasta la altura del socavón general (nivel 200) y regular la entrada de aguas en el canaleo, para cementar el cobre que llevasen. Este canaleo se encuentra junto al ferrocarril del Buitrón y lo vino explotando posteriormente Electrólisis del Cobre con resultados satisfactorios.

Los minerales de Poderosa fueron bajos en azufre, pero por ley en cobre pudieron encontrarse entre los primeros de la región, ya que contenían gran cantidad de calcopirita diseminada y también, mucha calcosina y covelina, depositadas como consecuencia de las grandes variaciones y profundidades que aquí debió alcanzar el nivel hidrostático, con aumento de la zona de enriquecimientos secundarios. Fue más cobrizo el filón estrecho, San Valentín, como desgraciadamente suele ser frecuente, alcanzando una ley media del 3,5% de cobre.

El transporte de minerales se hacía por el ferrocarril del Buitrón hasta San Juan del Puerto, y con barcasas o ferrocarril de vía normal desde ese punto a Huelva. Desde la mina salían los minerales por un ramal de vía muy estrecha, con tracción animal y pendiente favorable en cargado, hasta un plano inclinado automotor, que los vertía en unas tolvas—cargadero situadas en el km 67,5 del referido ferrocarril del Buitrón.



Figura 2.19. Instalaciones de canaleo para el aprovechamiento de metales en las aguas de mina. Mina Poderosa.



Figura 1.20. Recuperación hidrológico-forestal llevada a cabo en los años 2000 en Mina Poderosa.

Su último aprovechamiento data de los años 1990 y se extraían sulfuros y manganeso. Recientemente esta mina fue objeto de una restauración hidrológico-forestal en los primeros años de 2000 por parte de la empresa pública Egmasa, por la que se encapsularon antiguos acúmulos de mineral con arcillas, añadiéndose préstamos correctores de acidez al suelo y plantando ejemplares vegetales de especial resistencia a metales y bajo pH (*Pinus pinea*, *Pinus halepensis*, *Erica andevalensis*).

2.1.4. Minas de Soloviejo (Almonaster La Real, Huelva)

Localización: Coordenadas ETRS89 H29: X= 702.945, Y = 4.180.913.

Situada en el Paraje *El Viejo*, su acceso se realiza tomando la carretera N-435 (Cáceres-San Juan del Puerto) desde el Núcleo de El Campillo (Huelva). Tomando dirección Norte por esta carretera, en el p.k. 156, tomamos el acceso a mano derecha, donde existe una vivienda privada y a cuya familia se debe pedir permiso para el acceso. Las instalaciones mineras se encuentran a escasos 1.400 metros desde la carretera nacional.

Fue una de las principales explotaciones mineras de manganeso de la Península Ibérica. Aprovechada por la compañía Manganesos de Soloviejo, S.A. durante los siglos XIX y XX, extraía el mineral del derecho conocido como “La Joya de Almonaster”, estando activa hasta los años finales del siglo XX.

Es una de las mayores minas de la provincia, formada por una serie de concesiones alineadas a lo largo de un gran afloramiento de jaspes que se extienden de Este a oeste en unos 4.200 metros cruzados normalmente por la carretera general San Juan a Cáceres, en el kilómetro 68.

Puede considerarse dividido en 2 sectores, el occidental con las zonas Grulla, Pocito, y Rapiña, y el Oriental con las zonas Riscal, Poniente y Central-Levante.

Se encuentra el criadero entre las pizarras del carbonífero por el Sur y las porfiritas diabásicas por el Norte. Tiene dirección Oeste 25° N y es casi vertical.

Los jaspes aflorantes son rojos o morados, atravesados por una red de cuarzos blancos, de origen más moderno. La caja del filón está rellena principalmente de jaspes, presentándose el manganeso, a veces, en zonas emborrascadas y, en otras ocasiones, bastante limpios.



Figura 2.21. Situación de la Mina Soloviejo. Elaboración propia, 2017.

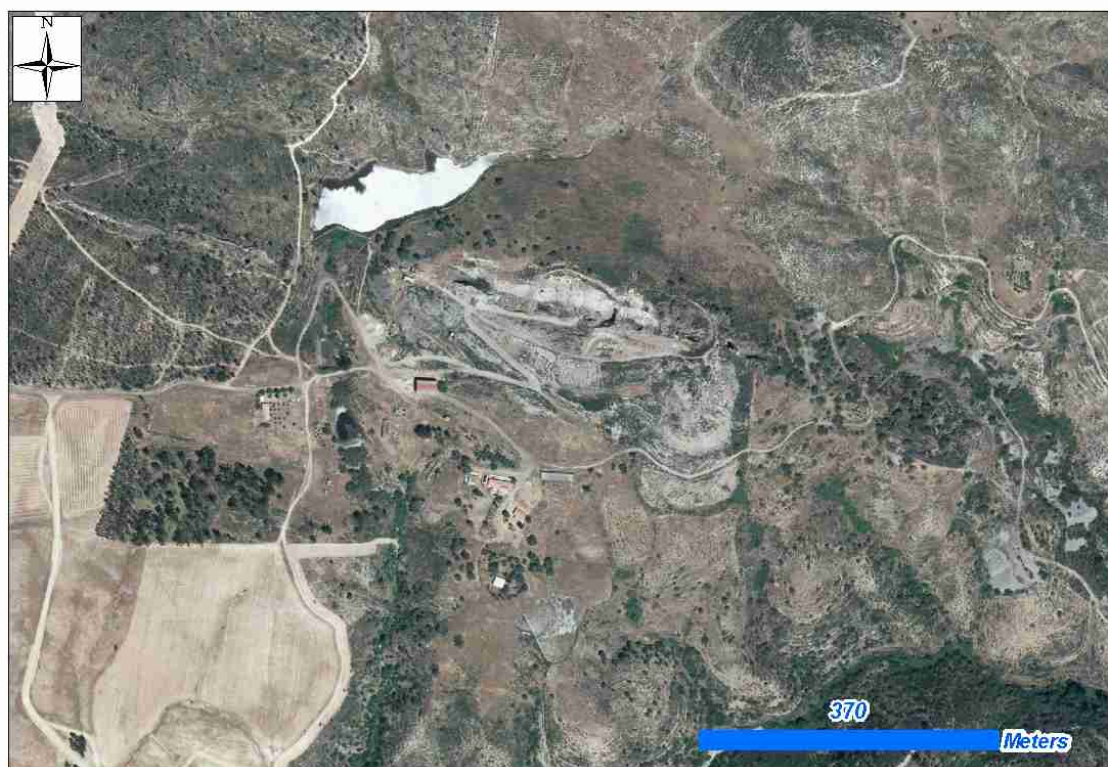


Figura 2.22. Ortofotografía digital aérea del emplazamiento de la Mina Soloviejo. Año 2013.



Figura 2.23. Corta minera en Soloviejo.



Figura 2.24. Restos de mineral en las inmediaciones de la corta minera de Soloviejo.

Es una mina antigua, según se desprende de los datos aislados que sobre producciones se han podido reunir:

En 1866 se obtuvieron en la Grulla 3.800 Tm. En todo el grupo se produjeron 1.950 Tm en el año 1890, 3.980 en 1891, 400 en 1903, 3.562 en 1906 y 3.525 en 1907. De 1916 a 1926 se produjeron unas 70.000 toneladas con leyes del 34 al 38% manganeso, que salieron en gran parte del removido de escombreras.

La potencia del filón varía entre 1 y 30 metros, y la mineralización es muy irregular dentro del mismo. Los minerales se presentan como pirolusitas o peróxidos, formando nódulos y concreciones o rellenando geodas; como manganeso metal, que es un óxido de brillo metálico, con leyes entre el 35 y 44% manganeso y minerales bastos con leyes entre el 15% y el 35% que requieren concentración, la cual no es fácil con las cribas normales por la unión íntima entre la sílice cuarzosa y el mineral de manganeso.

2.1.5. Mina San Platón (Almonaster La Real, Huelva)

Localización: Coordenadas ETRS89 H29: X= 705.004, Y = 4.182.121.

La Mina de San Platón se encuentra en la antigua Vía Férrea del ferrocarril del Buitrón, en el Paraje *Los Taramales* junto a la margen derecha del Río Odiel a su paso por este entorno salpicado de ruinas de antiguas minas.

El acceso, desde Mina Poderosa, se realiza por el camino hacia el Oeste durante 1,7 km metros, cuando nos encontramos el puente sobre el Río Odiel. Cruzando este puente, a unos 1.900 metros por la vía del antiguo ferrocarril (hoy desmantelado) pasando el cargadero de Soloviejo, encontramos las instalaciones de la antigua mina de San Platón.

El criadero de San Platón era uno de los más interesantes de la provincia por su continuidad en profundidad y por la ley de los minerales.

Arma en el contacto de pizarras por el Sur, con roca porfídica por el Norte. Por la zona Norte corre paralelamente al criadero un filón muy largo de manganeso que no se presenta al exterior con los típicos afloramientos de jaspes, sino por un cambio en la vegetación y el color oscuro de las tierras, entre las que se sacan óxidos con ley alrededor del 30% en manganeso.

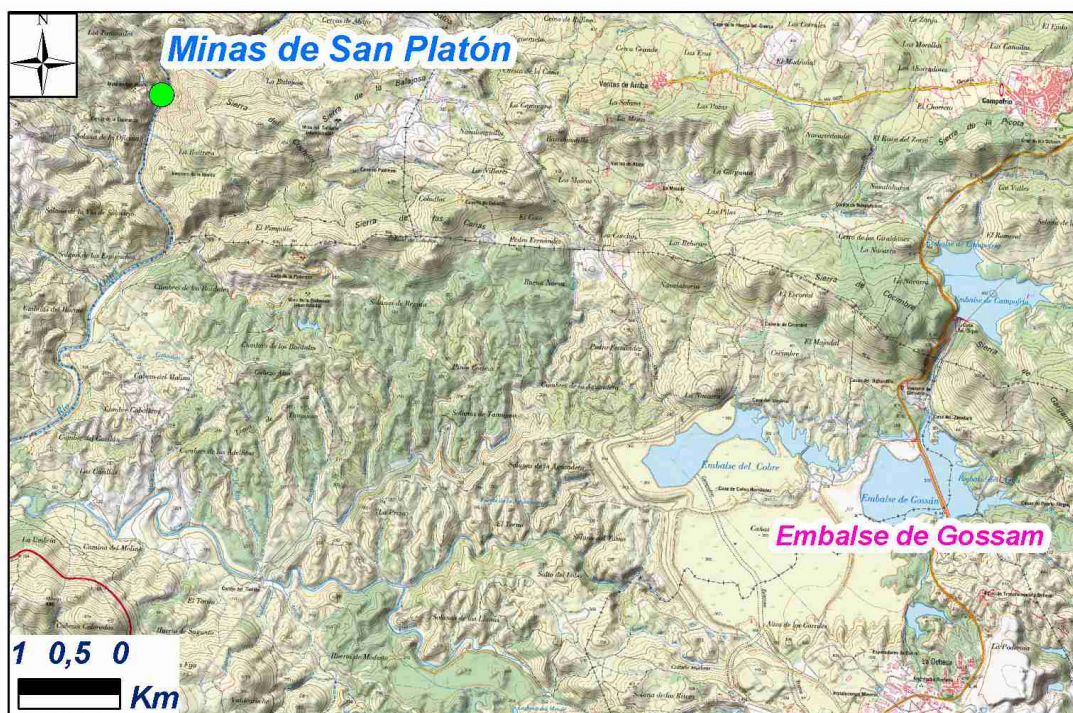


Figura 2.25. Situación de la Mina San Platón. Elaboración propia, 2017.



Figura 2.26. Ortofotografía digital aérea del emplazamiento de la Mina San Platón. Año 2013.

La dirección del afloramiento es O 15° N, y su buzamiento alrededor de los 75° Norte. Pueden distinguirse dos bandas paralelas de afloramiento separadas por una cuña de pizarras, siendo su principal característica la gran longitud. No presenta apenas montera de óxidos de hierro compactos pues ésta es insignificante comparada con la longitud del criadero; lo que al exterior más se aprecia son unas pizarras teñidas de óxidos, iguales a las que se encuentran en cientos de parajes en la región.



Figura 2.27. Fotografía del entorno de San Platón.

Este criadero se explotó muy poco en época romana, pues apenas se han encontrado sus típicos pocillos y galerías. Existen algunas escorias en la zona alta, que quizá correspondan a minerales extraídos de alguna ramificación del filón principal.

Según referencias, San Platón fue descubierto en el siglo XX por don Trinidad Díaz, el cual lo vendió a unos franceses que fundaron la *Compagnie des Mines de Cuivre de San Platón*, que explotó la mina desde 1906 a 1914. Antes que el descubridor, realizó trabajos de investigación un fuerte agricultor de la región que, según los mineros más ancianos, se arruinó antes de dar con la pirita.

En el criadero de San Platón se han arrancado, minerales hasta donde alcanza el Pozo Maestro, que mide 250 m. Por encima del nivel de la boca de este Pozo Maestro se han explotado unos 70 m con socavones y a cielo abierto.

La potencia se ha conservado bastante uniforme en los sucesivos pisos, llegando a los 16 ó 18 metros en la parte central. En el piso 13, que empezaba a prepararse al parar la mina, alcanzaba, según los datos antiguos, 16,50 metros, de los cuales 12 eran de los que entonces llamaban pirita cobriza y 4,50 de pirita de hierro.

La corrida del criadero es grande, pero desconocida, porque los trabajos de los diferentes pisos no se han continuado hasta el acuñamiento, tanto a Levante como a Poniente, debido, al parecer, a que la ley en cobre aumentaba más en profundidad que en sentido longitudinal.

La calidad de las piritas de San Platón ha sido excepcional por sus altas leyes en cobre, azufre y metales preciosos, con escasos contenidos en las impurezas arsénico, plomo y cinc.

Las reservas de mineral a la vista, según los cálculos hechos para régimen interno por los ingenieros franceses que dirigían San Platón eran algo superiores a las 500.000 toneladas, de las que el 70% serían pirita de hierro con 48% de S y 0,60% de Cu, un 20 % de pirita cobriza de 1ª clase con más del 2,50 % Cu, y un 10% de cobriza 2ª clase con más del 1,50 % Cu.

La mina, trabajó sin interrupción desde 1906 a 1922, con paradas y actividad intermitente hasta que en 1941 se dejó inundar la mina, con una producción potencial de 75.000 Tm año.

2.1.6. Arroyo Mina de la Peña del Hierro (Nerva, Huelva)

Localización: Coordenadas ETRS89 H29: X= 715.834, Y = 4.177.782.

A unos 2,7 km al Norte de Nerva, encontramos la Mina de La Peña del Hierro. Fue una de las principales explotaciones mineras del Andévalo, y a ella se llega recorriendo la carretera HU-6105 (Nerva a La Granada de Río Tinto) desde Nerva durante unos 2,7 km, tomando la bifurcación al Oeste (izquierda) bajo un paso inferior, y recorriendo unos 150 metros adicionales. Allí, junto a la escombrera Este de Peña del Hierro, discurre un pequeño arroyo donde se tomaron muestras para la presente Tesis.

Debe su nombre al gran crestón ferruginoso que corona la corta, el cual no se encuentra en la vertical de la masa de piritita sino algo desplazado con relación a la misma, extremo frecuente en estos criaderos y, también en los de manganeso.

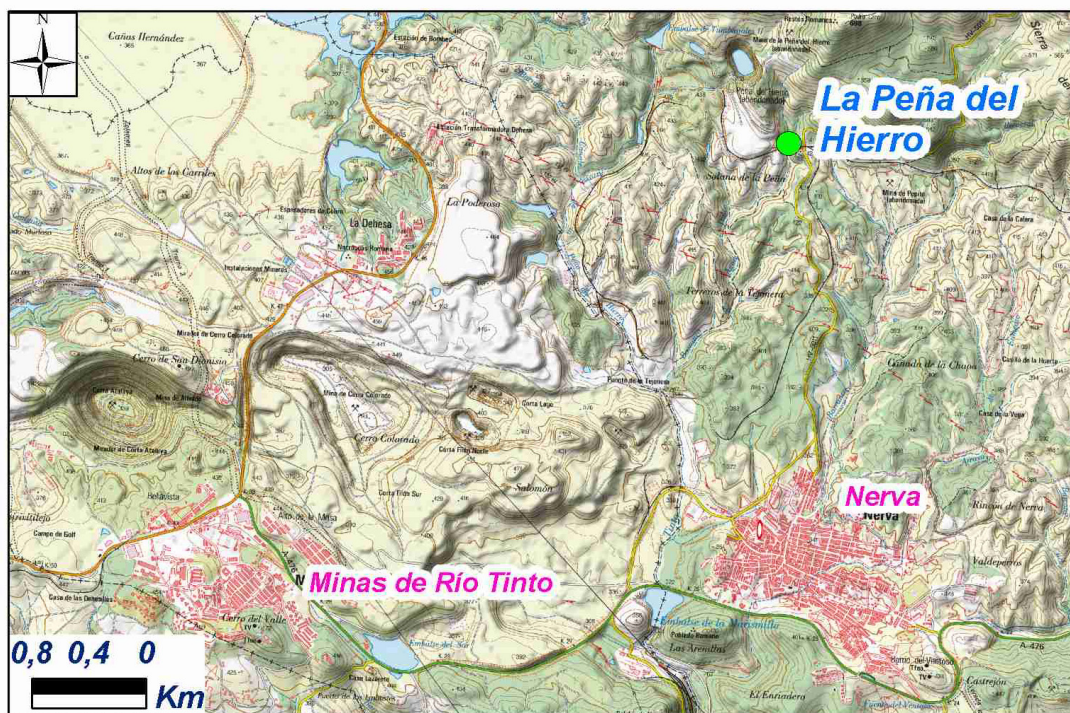


Figura 2.28. Situación de la Mina La Peña del Hierro. Elaboración propia, 2017.

El transporte fue el gran problema de Peña del Hierro, ya que las alternativas fueron todas excesivamente costosas:

- Transporte por el ferrocarril de Cala a Sevilla (92 km hasta el antiguo embarcadero de San Juan de Aznalfarache, Sevilla).
- Transporte por carretera a Huelva (85 km).
- Utilización del Ferrocarril minero de Riotinto. Habría sido la gran solución, pero inviable debido a los intereses de la Compañía Minera de Río Tinto, al no dejar florecer pequeñas empresas de venta de piritas.
- Por el ferrocarril del Buitrón. Transportando las piritas en camión volquete hasta Zalamea-El Campillo (18-20 km).



Figura 2.29. Ortofotografía digital aérea del emplazamiento de la Mina Peña del Hierro. Año 2013.



Figura 2.30. Entorno colindante a la corta minera de Peña del Hierro.

Peña del Hierro no fue explotada en época prefenicia ni romana, por lo que llegó virgen hasta las primeras labores de la sociedad Artaloitia sobre el año 1850. A

partir de aquí pasó por diferentes titularidades, hasta que la Compañía The Peña Copper Mines Ltd. la aprovechó desde 1901 a 1960, extrayendo unos 7 M Tm con leyes de cobre que variaban del 0,7 al 1,9 %

Las diferentes concesiones que componían La Peña aglutinaban unas 500 ha, y geológicamente el yacimiento pertenece al carbonífero inferior (culm) y al siluriano superior. Se encuentran dentro del horizonte más pirítico de la región onubense, que es además el más cuprífero.

Las rocas dominantes en esta gran superficie son pizarras, unas veces hojosas ,y otras más compactas y tabulares, intercalándose algunas veces delgadas capas de grauwacas de grano fino, siendo el color más corriente el gris, que suele pasar a oscuro, otros con tintes rojizos blanquecinos, rosados y amarillentos.

En menor extensión se aprecian manchas de pórfidos característicos, así como una zona manganesífera estrecha en las proximidades del afloramiento pirítico.

La explotación, a pesar de su escasa montera, se inició por interior, si bien a los pocos años, debido a su deficiente estrategia de extracción y peligros por estabilidad, a partir del año 1883 se aprovechó a cielo abierto.

2.1.7. Mina Concepción

Localización: Coordenadas ETRS89 H29: X= 707.751, Y = 4.181.150.

Mina Concepción se encuentra junto al poblado que se implantó para los trabajadores de esta mina, en el entorno de *Concepción*. Su acceso, se realiza a través de la carretera N-435 (Cáceres-San Juan del Puerto), en la cual, se toma la carretera HU-6103 (De N-435 a Minas de Concepción) a la altura del p.k. 156 hacia el Este, y por el que se deben recorrer unos 4,7 km hasta alcanzar el poblado de Concepción. La Mina, su corta minera, se encuentra en el suroeste del pueblo, con acceso inmediato desde las calles de la población.

Concepción es, de las grandes y antiguas minas explotadas durante finales del siglo XIX-XX, una de las que presentan mayor potencialidad.

Actualmente, los derechos de la Mina Concepción pertenecen a MATSA (Minas de Aguas Teñidas, S.A.U.), en los que durante los años 2013-actualidad, el consorcio perteneciente a Trafigura-Mubadala ha llevado a cabo un intenso programa de investigación que, probablemente, derive en los próximos años en un pase a concesión que suponga la reapertura de la Mina.



Figura 2.31. Situación de la Mina Concepción. Elaboración propia, 2017.

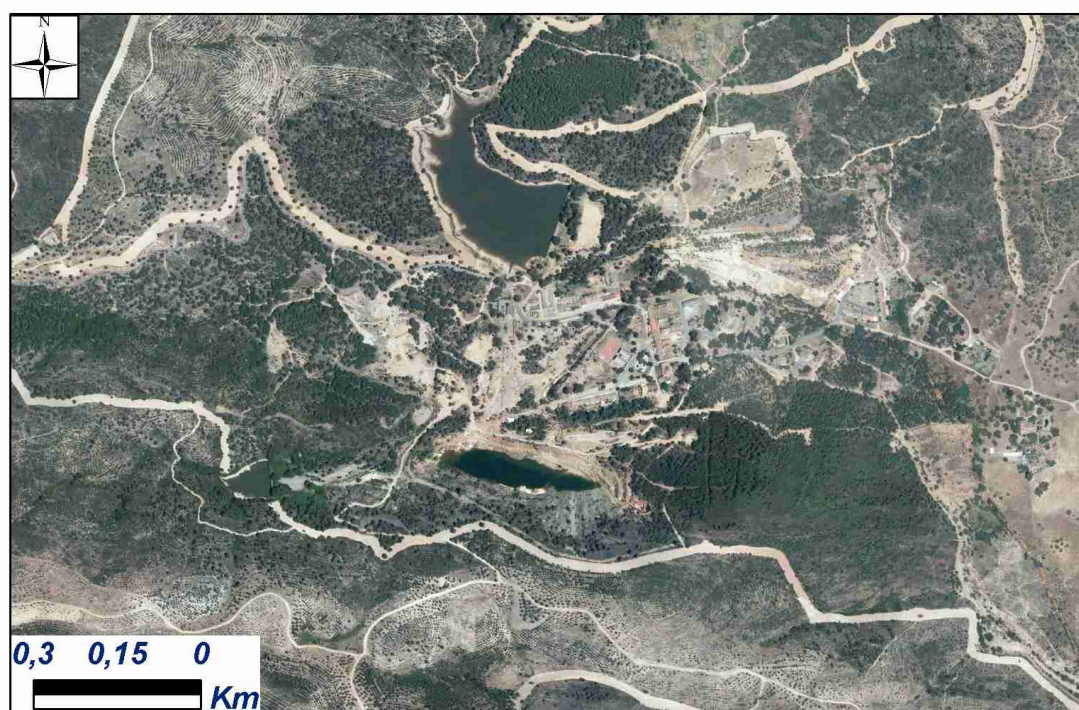


Figura 2.32. Ortofotografía digital aérea del emplazamiento de la Mina Concepción. Año 2013.



Figura 2.33. Corta de la Mina Concepción. Año 2013.



Figura 2.34. Otro aspecto de la Corta de la Mina Concepción. Año 2013.

Mina Concepción se encuentra muy próxima al río Odiel, que recibe aguas del interior de mina e instalaciones, siendo éste el punto donde se inicia la alteración química del Cauce.

La mina fue trabajada en la antigüedad desde Tartessos a romanos, siendo objeto de concesión administrativa en 1.575, e iniciándose la explotación contemporánea a mediados del siglo XIX, pasando por diversas propiedades (Familia Ibarra de Sevilla, United Alkali, Ltd. Compañía del Buitrón, Joaquín Ribera de Barcelona) hasta llegar por arrendamiento a la compañía Electrolisis del Cobre, S.A. que la explotó desde los años 1945 hasta su abandono en los años 60 tras una extracción de algo más del millón de toneladas de mineral.

La masa de Concepción tiene una dirección media Este-Oeste y es prácticamente vertical dado su pequeño buzamiento al Norte (80°).

Al Sur de la masa se encuentra una extensa mancha de pórfidos que se prolongan hacia los Taramales y San Platón, y por el Norte se halla una faja de unos 100 metros de espesor que, si bien parece pizarra metamorfizada no debe desecharse la posibilidad que sea roca eruptiva o el mismo pórfido del contacto Sur en estado de gran metamorfización.

El afloramiento, hoy desaparecido casi en su totalidad con la corta, lo formaban una serie de crestas ferruginosas interrumpidas, que por su discontinuidad y poco espesor no estaban en relación con la magnitud del depósito minero.

Inicialmente, el arranque se producía por interior, por el sistema de huecos y pilares en 2 pisos, para posteriormente a principios del siglo XX iniciarse la explotación a cielo abierto.

Posteriormente, en los años 1960, se retornó al arranque por interior mediante el sistema de corte y relleno, arrancando el mineral y rellenando posteriormente el hueco con estériles.

La mina cerró aprovechándose unas 60.000 Tm año con unas leyes de Cu del 1% (aunque había zonas que alcanzaba el doble) y 45-48% de S con muy bajos niveles de impurezas (As) que hacían de este mineral uno de los más codiciados de la faja.

En cuanto a las reservas de mineral, existen teorías que van desde la existencia de continuidad en las dimensiones y leyes de la masa en profundidad del criadero, a los que creen en el agotamiento del mismo.

En cualquier caso, desde la actividad en los años 60, se tiene constancia de la existencia de 1.057.000 Tm, más las probables y posibles a falta de investigación.

2.2. Puntos de muestreo

La toma de muestras se realizó en las citadas explotaciones mineras en tres jornadas, obteniéndose material in situ de los puntos de muestreo considerados.

El material de muestreo empleado, fue: mochila/bolsa de transporte, cucharita/espátula de metal, bisturí esterilizado, nevera portátil, contenedores de congelador, pinzas, cámara fotográfica, bolsas de autocierre de varios tamaños, botiquín, martillo grande, martillo pequeño, marcador (rotulador) permanente, bolígrafo, cincel grande, lápiz, linternas, cincel pequeño, pilas de repuesto, casco de seguridad, regla, cuaderno de muestreo, etiquetas de muestreo, eppendorfs estériles, caja de eppendorfs, placas de Petri estériles, GPS, cinta métrica, bolsa para basura, tubos Falcon de 50 ml para cultivo, mascarillas, brújula, grabadora, guantes, alcohol 96° (etanol), pañuelos de celulosa, plano escala 1:50.000 Situación, plano escala 1:10.000 Emplazamiento, plano escala 1:5.000 Ortofotografía digital aérea.

En general, se obtuvieron muestras de todo aquellos puntos que se consideraron que podían reunir las condiciones adecuadas para albergar hongos oxidantes de manganeso: zonas oscuras, presencia de manganeso en escombreras, acopios, vacies, vertederos, acumulaciones de sedimentos en cursos de agua, zonas de colores llamativos, etc. Se tomaron directamente a mano material pétreo, sedimentos, algas, lodos, sustancias mucilaginosas, etc.

Para la extracción de muestras se trató de mantener la mayor asepsia posible, con el empleo de guantes, materiales y utensilios lavados con alcohol tras la toma de muestras. Las muestras se conservaron, según su presentación, en tubos Falcon estériles, tubos eppendorf estériles y almacenamiento en bolsas de plástico con cierre.

Las muestras, una vez tomadas, se marcaron en el envase con rotulador indeleble y se numeraron, de modo que se anotó simultáneamente el código de cada muestra que se asignó in situ, con una numeración correlativa en un cuaderno, localización GPS, una breve descripción del entorno de la muestra, y el número de la fotografía que se tomaba. Las muestras se transportaron en neveras en frío.



Figura 2.35. Escombrera cercana a bocamina de la Mina Pepito.



Figura 2.36. Reguero cercano a bocamina en Mina Pepito.



Figura 2.37. Roca en Mina Poderosa.



Figura 2.38. Fragmento de mineral de manganeso en Minas de Soloviejo.



Figura 2.39. Costra existente en canaleo en Peña del Hierro.

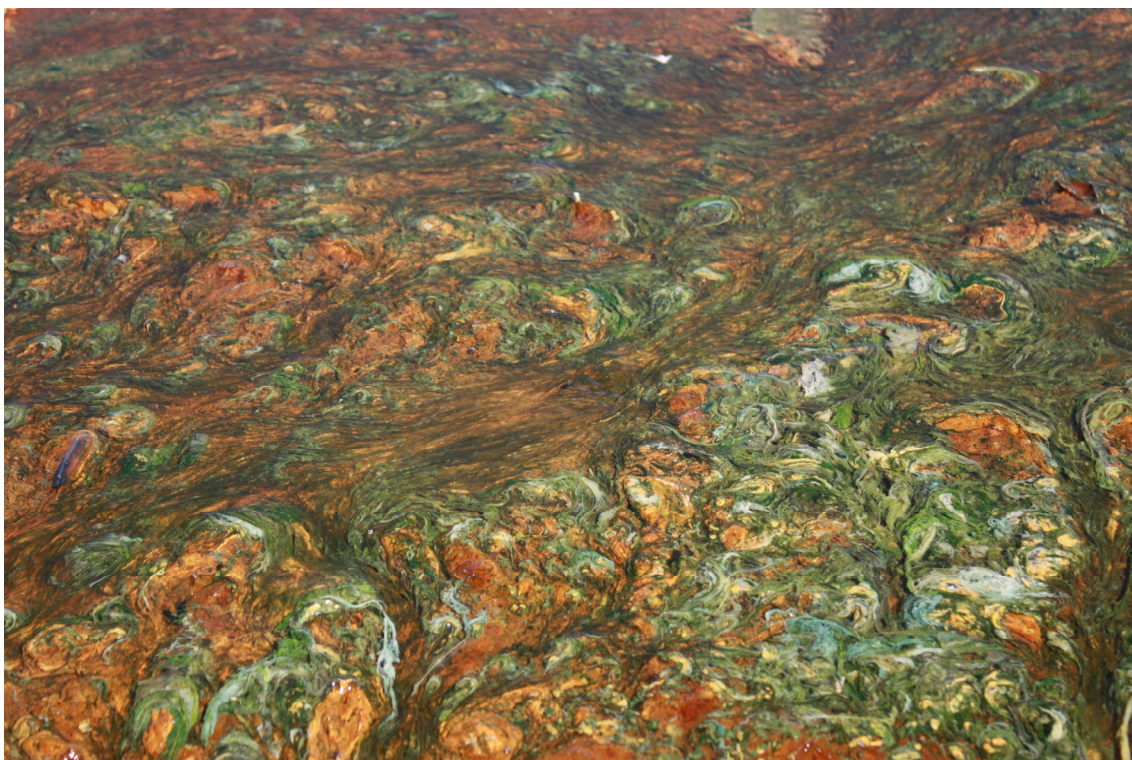


Figura 2.40. Sedimentos con algas en el área de Peña del Hierro.

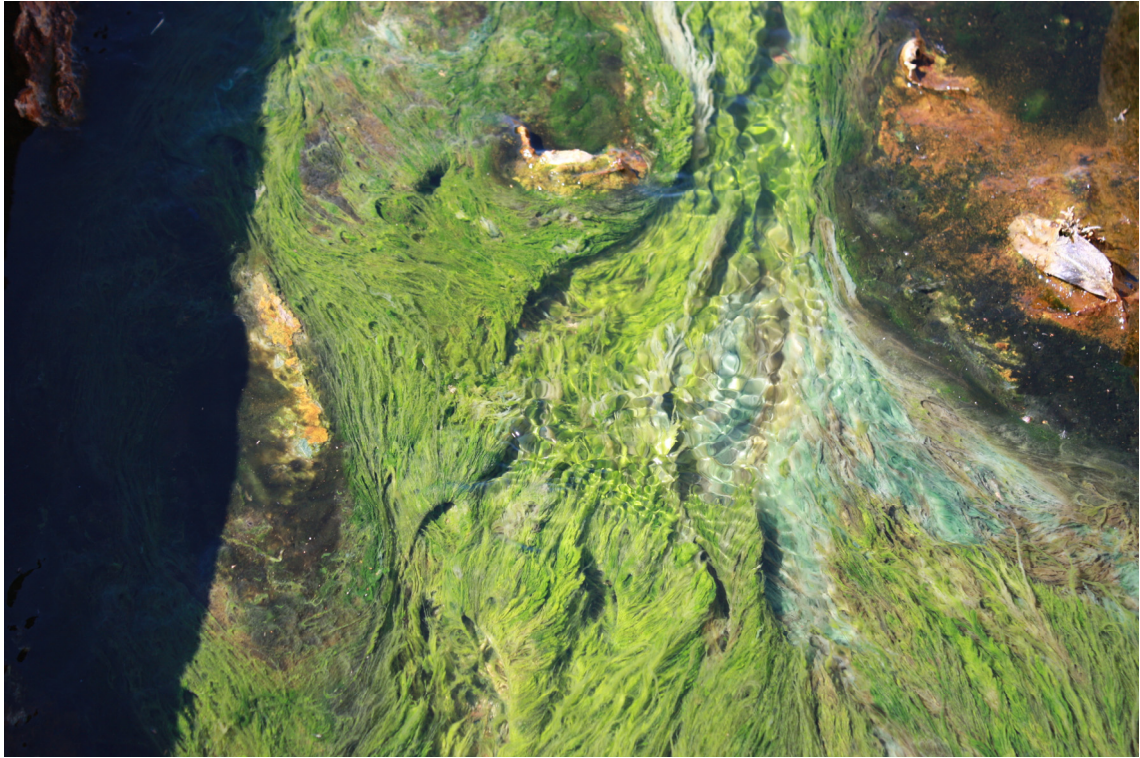





Figura 2.41. Sedimentos con algas en el entorno de la bocamina de Poderosa.




Figura 2.42. Punto de muestreo con tubo Falcon empleado para la toma.

2.2.1. Primer muestreo, realizado el 27 de noviembre de 2012

2.2.1.1. Mina Pepito (Nerva, Huelva)

ID Muestra	Descripción	Fotografía
1	Escombrera. Se tomó el material de la zona de la escombrera más cercana a la bocamina.	
2	Roca en el curso de agua.	
3	Roca cerca de la escombrera.	



2.2.1.2. Mina Cobullos (Nerva, Huelva)

ID Muestra	Descripción	Fotografía
5	Veta en el interior de la galería.	



2.2.1.3. Mina Concepción (Almonaster La Real, Huelva)

ID Muestra	Descripción	Fotografía
8	Morrongo en Corta Concepción.	

2.2.1.4. Mina Soloviejo (Almonaster La Real, Huelva)

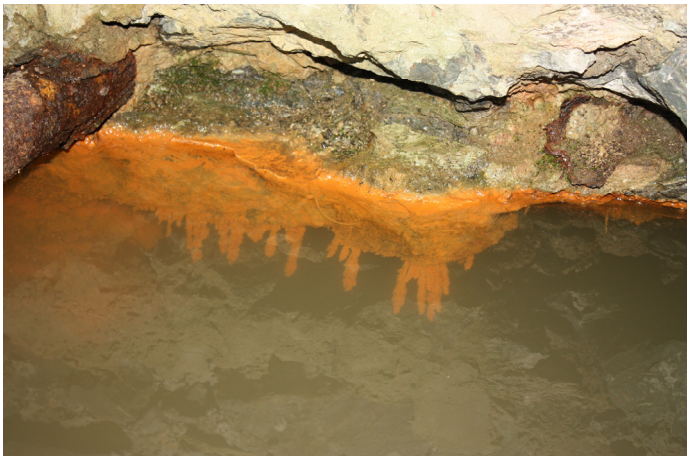


ID Muestra	Descripción	Fotografía
9	Superficie de roca de mineral de manganeso.	
10	Corta a cielo abierto	



2.2.1.5. Mina Poderosa (El Campillo, Huelva)

ID Muestra	Descripción	Fotografía
11	Corta minera	
12	Corta a cielo abierto en Poderosa "arriba".	



2.2.2. Segundo muestreo, realizado el 25 de abril de 2013

2.2.2.1. Mina Pepito (Nerva, Huelva)




ID Muestra	Descripción	Fotografía
1	Algas y sedimentos ferruginosos en fuente de la boca mina.	
2	Raspado de manchas en tubo de PVC con flujo de agua ferruginosa	
3	Sedimento en el curso del agua bajo el puente.	




ID Muestra	Descripción	Fotografía
4	Escombrera de manganeso.	
5	Roca con costra negra en el cauce cercano a la escombrera.	


2.2.2.2. Mina Peña del Hierro (Nerva, Huelva)

ID Muestra	Descripción	Fotografía
6	Sedimento naranja en el arroyo cerca de la Peña del Hierro.	 A photograph showing a stream bed covered with bright orange sediment. Some dry twigs and small rocks are scattered on the surface of the sediment.
7	Biofilm de color marrón en una roca cerca del Arroyo en el entorno Peña del Hierro.	 A close-up photograph of a rock surface covered in a thick, dark brown biofilm. A metal tool, possibly a scalpel, is placed on the rock to provide a sense of scale.


2.2.2.3. Mina Poderosa (El Campillo, Huelva)



ID Muestra	Descripción	Fotografía
8	Fango amarillo en una hondonada	 A photograph showing a close-up of bright yellow, fine-grained mud or silt. The mud is piled up in a small depression. A white ruler is placed vertically on the left side of the frame for scale, showing markings in centimeters.
9	Fango azul bajo hierba y esporofitos de musgos	 A photograph of a natural site showing blue-green mud. The mud is partially covered by dry grass and small, upright moss sporophytes. A white ruler is placed horizontally across the middle of the frame for scale.
10	Fango azul-blanco	 A photograph showing a patch of blue and white mud. The mud is surrounded by dry grass and some small rocks. A white ruler is placed horizontally above the mud patch for scale.

ID Muestra	Descripción	Fotografía
11	Algas en fango amarillo	
12	Mineral azul (melanterita)	
13	Espuma azul húmeda (melanterita)	

ID Muestra	Descripción	Fotografía
14	Algas verdes en espuma azul (melanterita)	

2.2.2.4. Mina San Platón (Almonaster La Real, Huelva)

ID Muestra	Descripción	Fotografía
15	Costra azul en el dique	

ID Muestra	Descripción	Fotografía
16	Material negro en el entorno del dique	
17	Mineral con cristales blancos en el dique	

2.3. *Procesado de las muestras*

Tras la toma de muestras en los diferentes viajes, las muestras se conservaron en frigorífico, a 5°C y se procesaron sin más demora.

Las muestras contenidas en bolsa de plástico estuvieron compuestas por rocas, materiales o sedimentos, de las que directamente se tomó, en cámara de flujo laminar, una pequeña fracción con espátula o palillo estéril y se depositó en una placa de Petri con un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de hongos, dejándose crecer en estufa a 25°C durante varios días. El resto del material se conservó en frío a 5°C. En los casos necesarios se procedió a la dilución del material.

Las muestras en tubos Falcon de 25 ml o eppendorf estuvieron representadas por materiales húmedos o fluidos de los que directamente se tomó una fracción con espátula o palillo estéril y se procedió a la siembra en cámara de flujo laminar

sobre placa de Petri con medio adecuado para el crecimiento fúngico. Se mantuvo en estufa durante varios días a 25°C. El resto de la muestra, se mantuvo en frío a 5°C.

Las placas sembradas, se rotularon con el medio de cultivo, la fecha de la siembra y el código de la muestra.

2.4. Medios de cultivos

Los medios de cultivo adecuados para el aislamiento de hongos fueron:

Extracto de malta agar (MEA). Para su preparación se partió de un medio ya preparado comercialmente, consistente en 20 g/l de extracto de malta DB y 20 g/l de agar Intron Biotechnology. Se añadieron todos los ingredientes a 1 l de agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Patata dextrosa agar (PDA). Medio ya preparado por Sigma para 1 l de agua.

Dicloran rosa bengala cloranfenicol agar (DRBC). Para un litro de medio se pesaron 30,6 g del medio comercial Scharlau, ya preparado y se completó con 5 g de agar, para obtener mayor solidez.

AY-HEPES con manganeso (AY-Mn). El medio de cultivo se preparó como describieron Miyata et al. (2004), con alguna modificación: tampón HEPES 20 mM (pH 7), acetato sódico 400 mg/l, extracto de levadura 150 mg/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 mg/l (=MnSO₄ 0,18 mM), K_2HPO_4 5 mg/l, y 2 ml de una solución de sales (Composición por litro: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,7 g, H_3BO_3 2,5 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,87 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,44 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,29 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 mg).

Todos los ingredientes excepto el cloranfenicol y el fosfato ácido de potasio, se mezclaron en recipiente de vidrio y a continuación se esterilizaron en autoclave, mediante un ciclo de 20 minutos a temperatura de 120°C y 1 atmósfera de presión. El fosfato ácido de potasio se autoclavó por separado.

Una vez esterilizado, se dejó enfriar hasta unos 60°C, momento en el que se añadió el cloranfenicol y/o el fosfato ácido de potasio. Se vertió el medio en las placas de Petri en condiciones de esterilidad.

2.5. *Crecimiento de hongos procedentes de muestras naturales en placas*

Tras la toma de muestras y su siembra en condiciones de esterilidad en los medios de cultivos especialmente indicados para el desarrollo de hongos se conservaron los cultivos en condiciones de oscuridad a 25°C durante un tiempo determinado por el propio crecimiento de las colonias de hongos.

En los primeros días, las colonias fúngicas empezaron a desarrollarse y no alcanzaron una colonización masiva de la placa. Este hecho es importante, debido a que la siembra de las muestras naturales en los medios seleccionados permitió que se desarrollaran una gran cantidad microorganismos en los medios de cultivos. Por lo tanto, se debió hacer un seguimiento a las placas, revisándolas diariamente, para identificar en una etapa temprana del desarrollo los posibles hongos presentes en las muestras tomadas.

Espaciando más tiempo el control de las placas es posible que los hongos alcanzaran un importante desarrollo de los hongos que no permitiera el aislamiento en cultivo axénico al entremezclarse las hifas de las diferentes cepas.

Por ello, cuando el crecimiento de las hifas era incipiente, resultó sencillo aislar los hongos seleccionados y poner en cultivo específico las cepas.

2.6. *Aislamiento de hongos y cultivo de cepas aisladas*

Las muestras se inocularon directamente tomando una pequeña porción de sustrato o bien se homogenizaron en un mililitro de una solución estéril de Tween 80 al 0,01%, y se realizaron cuatro diluciones decimales seriadas (10^{-1} - 10^{-4}). Se sembraron 100 µl de cada dilución en placas que contenían distintos medios de cultivo, con la ayuda de un asa de Drigalski estéril. Las muestras se cultivaron en MEA y DRBC para el aislamiento de hongos.

Las placas se incubaron a 25°C durante dos meses, permitiendo el desarrollo de los hongos de lento crecimiento. Se revisaron primero diariamente y posteriormente con menor periodicidad, aislando en cultivo axénico los hongos que fueron apareciendo.

En el momento que se detectó claramente el crecimiento de alguna cepa en la placa de Petri se procedió a aislar la cepa en cuestión.

Por ello, al localizarse en la placa incubada, se procedió, en cámara de flujo laminar y ambiente estéril, a abrir la placa y con un palillo o asa estéril, se tomó

una pequeña fracción del hongo (hifas visibles) y se sembró de nuevo en otra placa de Petri con medio adecuado.

La placa donde había crecido el hongo, se cerró con Parafilm y se devolvió a la estufa a 25°C, donde se mantuvo más días para comprobar si se desarrollaban hongos de crecimiento más lento.

La cepa aislada se marcó en la placa de Petri con el código del muestreo donde se tomó la muestra, el número de muestra, y el número correlativo que le correspondió de cepa aislada. Ejemplo: MH0413_3.4 (El hongo N° 4 aislado de la muestra 3 tomada en el viaje de muestreo de Minas de Huelva de Abril de 2013).

La nueva placa, se incubó de nuevo a 25°C donde tras 5 días se pudo comprobar si efectivamente se había efectuado correctamente el aislamiento y, morfológicamente (observación al microscopio óptico), no se apreciaban hifas diferentes pertenecientes a otras cepas de hongos.

Otra opción empleada, fue el cultivo en medio líquido en matraces Erlenmeyer. Para ello, la operación de siembra fue similar a la practicada con los medios sólidos, en la que se tomó, en cámara de flujo laminar, una pequeña fracción de material natural de la muestra y se introdujo en el medio de cultivo líquido previamente preparado en matraces Erlenmeyer, removiendo brevemente hasta que se desprendió el inóculo. Posteriormente, se desechó el palillo, o bien se esterilizó el asa de siembra para el siguiente uso.

Los matraces, se incubaron en estufa, durante el tiempo necesario, a 25°C.

2.7. Conservación de hongos aislados en colección

Para su conservación, todas las cepas se cultivaron en tubos con medio MEA inclinado, y se incubaron a 25°C en oscuridad hasta completar su crecimiento. Posteriormente, los cultivos se conservaron en colección a 5°C, donde se detiene el crecimiento del hongo, pero se mantiene vivo hasta su uso.

El tubo se cerró con cinta de Parafilm y se incubó unos días, al cabo de los cuales se apreció el crecimiento del hongo, y a continuación se conservó el tubo en frío, a 5°C. Es recomendable cada cierto tiempo refrescar estos cultivos, ya que pueden perder capacidad de desarrollo.

Para los hongos, se analizaron sus regiones ITS, siguiendo las metodologías a detallar posteriormente (extracción de ADN, PCR y análisis de secuencias).

2.8. Extracción de ADN genómico de cepas fúngicas

Todas las cepas aisladas se incluyeron en el análisis molecular. La extracción de ADN se realizó a partir del micelio de las colonias crecidas a 25°C en oscuridad sobre placas de MEA. Un centímetro cuadrado de micelio se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml que contenía 500 µl del tampón de extracción TNE (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM; pH 8) y perlas de vidrio de 2 y 4 mm de diámetro.

La mezcla se homogenizó utilizando un equipo Fast-Prep 24 (MP Biomedicals), aplicando dos ciclos de 45 segundos a una velocidad de 4,5 m/s. Se eliminaron las proteínas añadiendo 50 µl de dodecilsulfato sódico (10% p/v) y 70 µl de proteinasa K (10 mg/ml), y para ello, se incubó la mezcla a 50°C durante una hora.

El ADN se purificó con 750 µl de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1). La mezcla se centrifugó a 8.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se sometió a una purificación adicional con 450 µl de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1).

Se repitió la centrifugación en idénticas condiciones y se recogió el sobrenadante. La precipitación del ADN se realizó añadiendo 50 µl de acetato de sodio (3M) y 1 ml de etanol absoluto.

Para estimular la precipitación se incubó la mezcla a -20°C durante 30 minutos y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se lavó con etanol (70%) y se dejó secar a temperatura ambiente.

Finalmente, el ADN precipitado se disolvió en 100 µl de agua ultra pura estéril y se cuantificó la concentración resultante utilizando un equipo NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de la extracción se conservaron a -80°C hasta su uso.

2.9. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó un marcador para la caracterización molecular de las cepas: las regiones del ADN ribosómico que corresponden a los espaciadores internos transcritos 1 y 2 (ITS1 e ITS2). Estas son regiones no codificantes situadas entre los genes ribosómicos 18S y 5.8S (ITS1), y entre 5.8S y 28S (ITS2), por ello son zonas muy variables que acumulan mutaciones y resultan especialmente útiles para diferenciar especies dentro de un mismo género.

Se utilizaron los cebadores universales ITS1 (5'-TCC GTA GGT CCT GAA GCG G-3 ') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') descritos por White et al. (1990), que amplifican en eucariotas la región ITS1-5.8S-ITS2 de longitud variable según el organismo, generalmente comprendida entre los 400 y 900 pares de bases (pb).

Cada reacción de PCR se desarrolló en un volumen final de 50 µl. La mezcla de reacción estuvo compuesta por 5 µl de tampón de reacción 10X [Tris-HCl 750 mM (pH 9), KCl 500 mM, (NH₄)₂SO₄ 200 mM], 2 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µl de cada primer 50 µM (Invitrogen Life Technologies), 5 µl de la mezcla de desoxiribonucleótidos (dNTPs) (Bioline GC Biotech), 2 mM cada uno, 0,25 µl de la enzima Taq polimerasa (5 U/µl) (Biotools M&B Labs), 10-20 ng de ADN molde, y se completó el volumen de reacción con agua ultra pura estéril.

Todas las muestras se analizaron por duplicado y se incluyeron dos controles negativos, que contenían agua ultra pura estéril reemplazando el ADN molde, para cada tanda de reacciones.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador iCycler (Bio-Rad). El protocolo utilizado para la amplificación de las regiones ITS consistió en: 2 minutos de desnaturalización inicial a 95°C; 35 ciclos compuestos por 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C, y 1 minuto a 72°C; seguidos de 5 minutos de extensión final a 72°C. El protocolo utilizado para la región del gen RPB2 fue el descrito por Liu et al. (1999), compuesto por: 5 minutos de desnaturalización inicial a 95°C; 35 ciclos compuestos por 1 minuto a 95°C, 2 minutos a 55°C, y 1,5 minutos a 72°C; seguidos de 10 minutos de extensión final a 72°C.

La amplificación de cada muestra analizada se comprobó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (1% p/v) con tampón TAE 0,5X (Tris 20 mM, ácido acético glacial 10 mM, EDTA 0,5 mM). Para cada reacción se cargaron 5 µl del producto de PCR homogenizado con 3 µl de tampón de carga de electroforesis [Tris-HCl 50 mM, sacarosa 0,25 g/ml, azul de bromofenol 1 mg/ml, SDS 5 mg/ml, SYBR Green I 2 µl/ml (Roche Diagnostics)]; el SYBR Green I emite fluorescencia al unirse con el ADN amplificado.

La electroforesis se desarrolló en un equipo Sub-Cell GT Cell (Bio-Rad) a 80 V durante 25 minutos. Los geles se observaron con un transiluminador ECX-26.MX (Vilber Lourmat) que emite luz U.V. a una longitud de onda de 312 nm. Las imágenes de los geles se captaron con un equipo Kodak EDAS-290 (Kodak) utilizando el programa "Kodak 1D v. 3.5.4. Imaging Scientific System" (Kodak).

Los productos amplificados se purificaron mediante el uso del kit JETquick Spin (Genomed) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.10. Análisis de secuencias de ADN.

Los productos de PCR purificados se secuenciaron por duplicado en la empresa Secugen (CIB-CSIC, Madrid), con un secuenciador capilar ABI 3700 (Applied Biosystems), utilizando los mismos cebadores que para la PCR.

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit 7.0.5.3. (Hall, 1999), estableciendo las secuencias consenso para cada marcador y cepa analizada.

Éstas se compararon por alineamiento múltiple, para cada uno de los marcadores estudiados, utilizando la aplicación Muscle (Edgar 2004) incluida en la página web del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/>).

Todas las secuencias que no fueron idénticas entre sí se depositaron en las bases de datos nucleotídicas (GenBank), utilizando la aplicación del Archivo Europeo de Nucleótidos (ENA), incluida en el EMBL-EBI.

Sobre estas secuencias se realizó el correspondiente análisis de similitud utilizando el algoritmo BLASTn (Altschul et al., 1997), incluido en la página web del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI, USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), comparándose con todas las secuencias existentes en las bases de datos.

2.11. Identificación morfológica de especies de hongos

Para este tipo de estudio, en contados casos, fue fundamental llevar a cabo una caracterización morfológica, tanto macroscópica (colonias desarrolladas en distintos medios de cultivo) como microscópica (características del micelio y estructuras de reproducción). Este método solo se aplicó a las cepas MH0413_H3.3 y MH0413_H3.4, de dudosa afiliación dado su bajo porcentaje de similitud (93%) con las secuencias de colección.

El estudio morfológico se realizó en colaboración con la Dra. Alena Nováková, micóloga experta en taxonomía de hongos, del Instituto de Biología del Suelo, Academia de Ciencias, České Budejovice, República Checa.

Para caracterizar la morfología de las colonias y las estructuras microscópicas, las cepas se cultivaron en placas de Petri con distintos medios de cultivos. Las placas se incubaron a 25°C durante 14 días, tras ello se describió la morfología de las colonias. La identificación, en ambos casos, correspondió a *Acrostalagmus luteoalbus* (100%).

2.12. Selección de hongos con capacidad potencial de oxidar manganeso. Comparación de la morfología y el crecimiento en medios con y sin manganeso

Con las cepas de hongos aisladas se procedió a evaluar su papel en el ciclo biogeoquímico del manganeso. A tal fin se procedió a realizar un ensayo para conocer qué cepas tenían capacidad de oxidación del manganeso. Para ello se sembró por separado una misma cepa aislada en medios idénticos con y sin manganeso. Se seleccionó el medio AY (sin manganeso) y el AY-Mn (con manganeso), y se procedió a la siembra e incubación 5 días a 25°C.

Tras observar el crecimiento del hongo, se comprobó que el hongo con capacidad de oxidar el manganeso oscurecía sus hifas mientras que el hongo sin ella no.

También es posible que el oscurecimiento se pueda deber a otra circunstancia (formación de melaninas, por ejemplo), por lo que todos estos hongos se seleccionaron de forma preliminar, si bien se procedió a comprobar en una fase siguiente, mediante otras técnicas, que el oscurecimiento se debía a acumulaciones de manganeso y no a otras sustancias (melaninas). Este test se realizó tanto en medios líquidos (matraces) como en medios sólidos (placas de Petri).

2.13. Oxidación del manganeso mediada por hongos

Existen muchos microorganismos, entre ellos hongos y bacterias, capaces de oxidar el manganeso. Este elemento es soluble en estado reducido (II), y al oxidarse (III y IV principalmente) genera precipitados de color negro. En este apartado se evaluó la capacidad de los hongos aislados para oxidar el manganeso. Se seleccionaron principalmente las cepas aisladas de muestras que presentaron una coloración oscura en los medios con manganeso.

Las cepas se cultivaron por duplicado en placas de medio AY (acetato sódico 400 mg/l, extracto de levadura 150 mg/l, agar 15 g/l) con o sin la adición de una fuente de manganeso (MnSO_4 1 mM) (Miyata et al., 2004). Las placas se sembraron con discos de 9 mm de diámetro extraídos de cultivos en crecimiento activo en MEA, y se incubaron a 25°C durante 20 días. Tras este periodo, se evaluó el aspecto de las colonias, prestando atención a cualquier oscurecimiento de las colonias desarrolladas en el medio AY con manganeso.

En aquellas especies que formaron colonias oscuras en ambos medios de cultivo, se evaluó la presencia de depósitos de óxidos de manganeso por observación de su micelio al microscopio óptico.

Los hongos que sólo desarrollaron colonias oscuras en el medio que contenía manganeso, fueron objeto de análisis adicionales para confirmar que esta coloración se debía a la presencia de óxidos de manganeso. Su micelio se analizó por microscopía óptica y FESEM-EDS.

Adicionalmente, las especies que demostraron la capacidad de inducir la oxidación del manganeso se cultivaron en medio líquido AY-HEPES-Mn con el objeto de estudiar más detalladamente la morfología y distribución de los precipitados ricos en óxidos de manganeso. Los cultivos se prepararon por duplicado en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 100 ml de medio AY-HEPES-Mn, cada uno de los cuales se inoculó con 100 µl de una suspensión de conidios ($3,2 \times 10^7$ conidios/ml). Los matraces se incubaron durante 20 días a 25°C en oscuridad y sin agitación. Tras ello, se recogieron muestras del micelio desarrollado, se secaron a 37°C durante toda la noche, y se realizaron los análisis FESEM-EDS.

2.14. Confirmación de la capacidad de síntesis de manganeso. FESEM

Las cepas capaces de oscurecer el medio con manganeso, y sin oscurecimiento en medios libres de manganeso, se analizaron mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido (FESEM) para confirmar la naturaleza del oscurecimiento. A tal fin, se tomó una fracción de las hifas oscurecidas en medios con manganeso y se pasaron a un portaobjetos.

El análisis FESEM consistió en el uso de la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) y espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS). Estas técnicas se utilizaron para caracterizar la morfología y composición química de los óxidos de manganeso, y detectar las estructuras microbianas asociadas a ellos.

Para el análisis FESEM no fue necesaria una fijación previa de las muestras. Directamente se recubrieron mediante pulverización catódica ("sputtering") con una capa fina de oro y paladio, y se observaron con un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-7001F con filamento/columna de emisión de campo (FESEM), en modo de electrones secundarios, y equipado con un detector de energía dispersiva de rayos X (Oxford Instruments). La energía del haz de electrones utilizada fue de 15 kV y se tomaron imágenes a diferentes aumentos.

Los microanálisis de EDS proporcionaron información cualitativa y semicuantitativa de la composición química de las muestras, representada con espectros e imágenes de distribución de los elementos químicos presentes en la

muestra. Estos espectros se obtuvieron mediante el software INCA. Para el análisis semicuantitativo se ha utilizado el método de corrección ZAF que tiene en cuenta el aporte del número atómico (Z), la absorción (A) y la fluorescencia (F).

Con ello se comprobó que no todas las cepas seleccionadas oscurecían a causa de la oxidación del manganeso. Algunas cepas, como se apreció en las imágenes FESEM, mostraron claramente que las hifas poseían nódulos de manganeso. Otras cepas, no presentaron estas formaciones.

2.15. Espectroscopía de infrarrojos con transformada de fourier (FT-IR)

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (“Fourier transform infrared spectroscopy”, FTIR) es una técnica de espectroscopía molecular y un método de análisis químico, aplicable en prácticamente cualquier campo, pues ofrece análisis cualitativos y cuantitativos de una gran variedad de muestras orgánicas e inorgánicas (Griffiths y De Haseth, 2007).

Antes de comenzar con los análisis propiamente dichos, fue preciso eliminar las moléculas de agua de la muestra, secándola a 70°C durante 24 horas, y limpiar todo el material necesario con alcohol. A continuación, con la muestra seca se preparó una pastilla transparente, mezclando 1 mg de muestra y 100 mg de KBr aproximadamente, siendo triturados conjuntamente en un mortero de ágata. La mezcla triturada obtenida fue introducida en un molde de 13 mm de diámetro para la preparación de pastillas al vacío (Atlas™ Evacuable Pellet Dies, SPECAC, UK). Este molde fue introducido a su vez en una prensa hidráulica manual (SPECAC, UK) a la que se conectó una bomba de vacío (SCHOTT Ibérica, España) que eliminó el aire y la humedad durante el proceso de prensado. Se aplicaron 10 toneladas de presión sobre la muestra triturada para, finalmente, obtener una pastilla fina, compacta y transparente.

Los análisis de las pastillas de KBr obtenidas se realizaron en un espectrofotómetro FTIR-6300 (JASCO, Japón), asociado al programa informático Spectra Manager versión 2 (JASCO, Japón). Los parámetros empleados fueron un rango de medida de longitud de onda en la región de 400-4000 cm^{-1} y una resolución de 2 cm^{-1} en modo de transmitancia, con un detector termal estándar de tipo TGS (Tri-Glicerina-Sulfato) suministrado con el instrumento.

Se analizaron mediante FTIR muestras de birnesita sintetizada en el laboratorio, para obtener espectros de infrarrojos con los que poder comparar los espectros obtenidos de las muestras de origen biogénico. La mayoría de los minerales de

óxidos de manganeso tienen muy baja cristalinidad, lo que dificulta su identificación mediante difracción de rayos X. La espectroscopía FTIR es una técnica que facilita su análisis, ya que es sensible tanto a materiales cristalinos como a materiales amorfos (Potter y Rossman, 1979).

2.16. Síntesis de birnesita por el método de Oaki e Imai (2007)

La producción de óxidos de manganeso en el laboratorio es un paso importante para lograr comprender el mecanismo por el que se lleva a cabo la oxidación microbiana (Miller et al., 2013).

Con el objetivo de obtener birnesita con la que poder realizar comparaciones con las muestras de óxidos de manganeso biogénicos, especialmente para los estudios mediante SEM y FTIR, se procedió a realizar el protocolo de obtención de birnesita sintética descrito por Oaki e Imai (2007), con algunas modificaciones.

Se partió de 300 ml de una solución stock de EDTA dihidratado (20 mM), preparada con agua destilada a temperatura ambiente, en la que se disolvió mCl_2 (20 mM). Para cada reacción de síntesis de birnesita, se tomaron 25 ml de la solución stock en un tubo de centrifuga de polipropileno.

A continuación, sobre la solución stock se añadieron 25 ml de NaOH (200 mM) mediante una pipeta Pasteur, gota a gota. En cuanto se produjo el contacto entre el NaOH y la solución stock, se obtuvo inmediatamente un líquido transparente amarillo que fue cambiando a marrón oscuro de aspecto turbio en unos 3 minutos.

A los 30 minutos se pudieron observar precipitados en la base del tubo de centrifuga y a los 90 minutos el sobrenadante se volvió claro mientras una masa de color pardo precipitaba en el fondo del tubo lentamente. El tubo de centrifuga se selló con Parafilm M® (Bemis NA, EE.UU) y se dejó reposar a temperatura ambiente de 3 a 5 días.

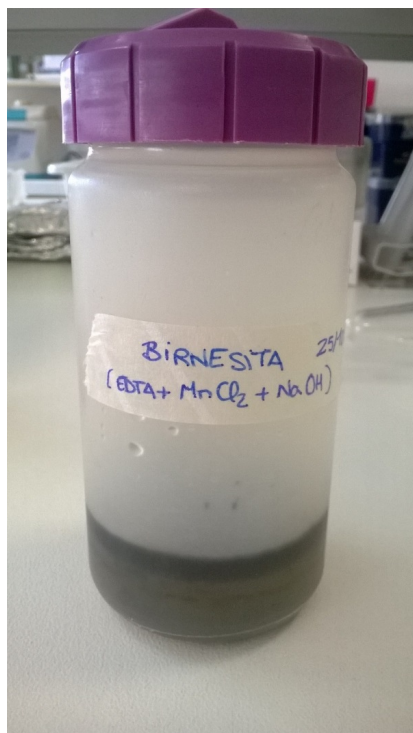


Figura 2.43. Birnesita sintética tras la reacción.

Pasado ese tiempo, toda la birnesita precipitó, tanto en las paredes como en el fondo (Figura 2.42) del tubo de centrifuga. Finalmente, en algunos casos fue necesario centrifugar a 250 rpm durante 2 minutos para facilitar la separación del precipitado respecto al sobrenadante, mientras que en otros casos no fue preciso.



Figura 2.44. Birnesita sintética recogida en el tubo de centrifuga.

2.17. Síntesis de birnesita mediante oxidación con H_2O_2

Sobre el anterior protocolo se probaron varias modificaciones con el objetivo de acelerar un proceso de síntesis de birnesita en el que no fuera necesaria una espera de 3-5 días para completar el proceso.

Para ello, se pensó en añadir al reactivo hidróxido de sodio, otro de superior poder oxidante, seleccionando para ello el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

De esta forma, se partió de 300 ml de una solución stock de EDTA dihidratado (20 mM), preparada con agua destilada a temperatura ambiente, en la que se disolvió MnCl_2 (20 mM). Para cada reacción de síntesis de birnesita por este método modificado, se tomaron 50 ml de la solución stock. A continuación, sobre la solución stock se añadieron 25 ml de H_2O_2 sin apreciarse reacción alguna.

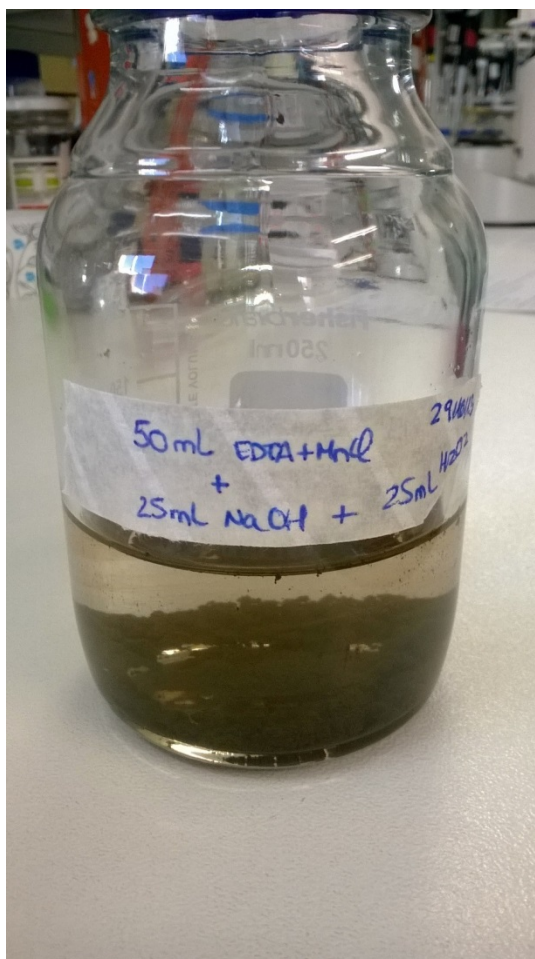


Figura 2.45. Birnesita obtenida por reacción con H_2O_2 .

Se añadió NaOH (200 mM) mediante una pipeta Pasteur, gota a gota. En cuanto se produjo el contacto entre el NaOH y la solución stock, se obtuvo inmediatamente un líquido marrón claro que fue cambiando a marrón oscuro de aspecto turbio en unos 3 minutos. Se apreció un cierto burbujeo sin violencia, y no se produjo incremento de temperatura.

Se dejó reposar, sellando la botella de vidrio con Parafilm M® (Bemis NA, EE.UU) y se dejó reposar a temperatura ambiente 24 horas.

Pasado ese tiempo, toda la birnesita precipitó en el fondo del vaso, (comprobado pH 11,91) y se fue retirando el sobrenadante y realizando sucesivos lavados con agua destilada hasta pH 9,36.

El precipitado resultante se centrifugó 2 minutos a 1000 rpm y se retiró el precipitado que se dejó secar en estufa a 30°C durante 3 días.

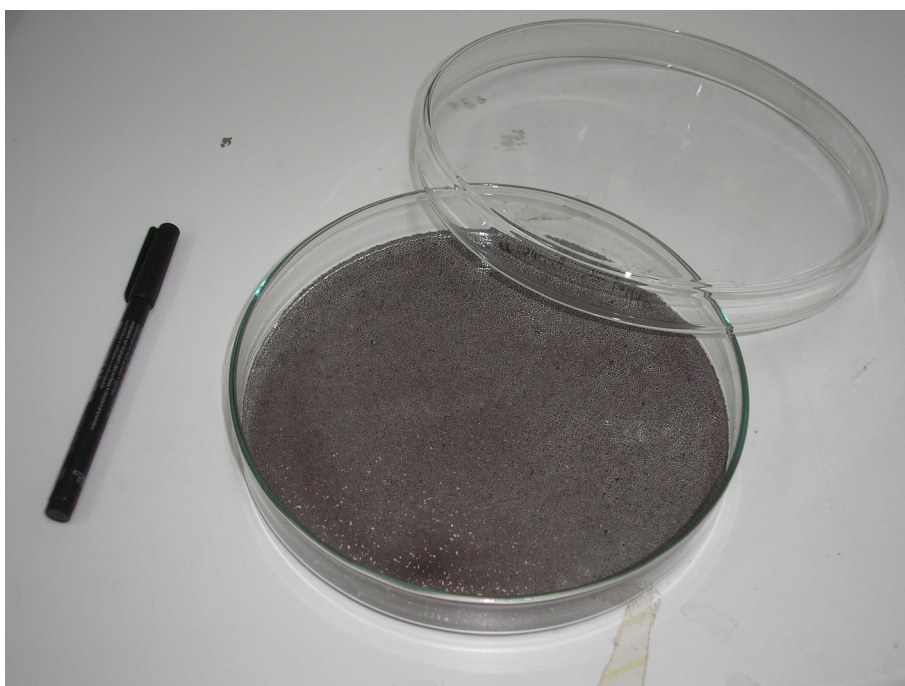


Figura 2.46. Birnesita sintética precipitada y desecada.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Biogénesis de minerales en la Faja Pirítica Ibérica

Se realizaron dos campañas de muestreos en distintas estaciones y años con lo que se cubrió la práctica totalidad de los lugares accesible de la Faja Pirítica Ibérica (FPI), donde estaban documentadas la existencia de minas de manganeso y escombreras.

En una primera campaña de muestreo realizada el 27 de octubre de 2012 se visitaron las minas Pepito y Cobullos en Nerva, Poderosa en El Campillo, Concepción y Soloviejo en Almonaster la Real, tomándose un total de 12 muestras.

En la segunda campaña (25 abril de 2013) se visitaron nuevamente las minas Pepito y Poderosa y como nuevos enclaves se incluyeron la Peña del Hierro y la Mina San Platón, de donde se recogieron un total de 17 muestras.

Del total de 29 muestras se descartaron algunas por no ser relevantes para la investigación propuesta, bien por contener minerales ajenos al manganeso, o por ser películas microbianas constituidas fundamentalmente por algas, obtenidas del lecho de arroyos o ríos, o líquenes y musgos sobre rocas.

De entre todas las muestras obtenidas en las dos campañas de muestreo se seleccionaron aquellas que pudieran ser relevantes para investigar la existencia de procesos de bioinducción o biomineralización por microorganismos, en general, y detectar la presencia de minerales de manganeso en suelos, rocas, sedimentos, escombreras.

La confirmación de procesos biogénicos y/o la presencia de minerales del manganeso podría permitir conocer el tipo de estructura en que se encuentran los óxidos de manganeso en la naturaleza, que pueden tener un origen biótico (inducido por microorganismos) o abiótico. Igualmente, se ha sintetizado un óxido de manganeso en el laboratorio, con lo que se cubrió la posibilidad de estudiar su estructura en el caso de formación abiótica.

Por otra parte, también se han estudiado algunas otras muestras recogidas en distintos nichos, como sedimentos bajo el agua en la boca de Mina Pepito o en la orilla de la corta de la Peña del Hierro. En estos casos, se esperaba obtener imágenes de minerales de hierro, que suelen estar asociado a los de manganeso.

En las Figuras 3.1-2 se muestran las imágenes FESEM del sedimento obtenido en el flujo de agua ferruginosa de la boca de la Mina Pepito. En la imagen se observa claramente la presencia de bacterias filamentosas oxidante del hierro, semejantes a las ya publicadas por otros autores (Figura 3.3)

La jarosita es un mineral ampliamente distribuido en la cuenca del río Tinto y en Faja Pirítica Ibérica (Figuras 3.4 y 3.5). Es un sulfato de potasio e hierro

hidratado, que se forma en medios ácidos. Forma agregados de cristales cúbicos o pseudocúbicos, de aproximadamente 1 μm (Herbert, 1997).

Oggerin et al. (2013) demostraron la biomineralización de jarosita por acción del hongo *Purpureocillium lilacinum*. Este hongo, aislado de la cuenca del río Tinto, induce la formación de un precipitado de color ocre identificado como jarosita, que aparece en abundancia en los márgenes del río Tinto.

La jarosita se nuclea sobre las paredes del hongo, asociado a las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), debido a la supersaturación de iones Fe. El proceso ocurre tanto en células vivas, como muertas, aunque en este caso en mucha menor cantidad. Sasaki et al. (2006a) comprobó, mediante FESEM, que la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* formaba amoniojarosita a partir de arsenopirita (Figura 3.6).

En los sedimentos recogidos en el lago formado por la corta de la Peña del Hierro se pudo observar la presencia de este mineral junto a células microbianas, apuntando a un origen biogénico (Figuras 3.7 y 3.8). Es conocida que la elevada concentración de iones férricos y sulfatos, productos de la alteración de la pirita, genera una serie de minerales como yeso, jarosita, goetita y hematita, todos los cuales han sido detectados en la FPI.

En la muestra del sedimento del lago de la Peña del Hierro también se observaron la presencia de microorganismos asociados a la jarosita. En aguas de pH ácido (0 a 5) ha sido descrita la presencia del alga unicelular *Cyanidium caldarium* (Rhodophyta), que ha sido identificada taxonómicamente por la Prof. Mariona Hernández-Mariné, de la Universidad de Barcelona, en muestras de la FPI que le hemos proporcionado tanto de las aguas del lago como de las rocas de la orilla, donde adopta un crecimiento endolítico. Su morfología es claramente diferente a la de *Coccomyxa onubensis*, un alga verde recientemente descrita y aislada de las aguas del río Tinto, ya que esta muestra células elipsoidales y de menor tamaño (3 μm de longitud y 2 μm de ancho (Fuentes et al., 2016).

Gómez et al. (2012) encontraron clones de *C. caldarium* en nichos endolíticos y chasmoendolíticos de depósitos de sales en la cuenca del río Tinto. Walker et al. (2005) también describieron una comunidad endolítica formada por especies de *Cyanidium* en calcedonia del Norris Geyser Basin, Yellowstone National Park, USA (Figura 3.9).

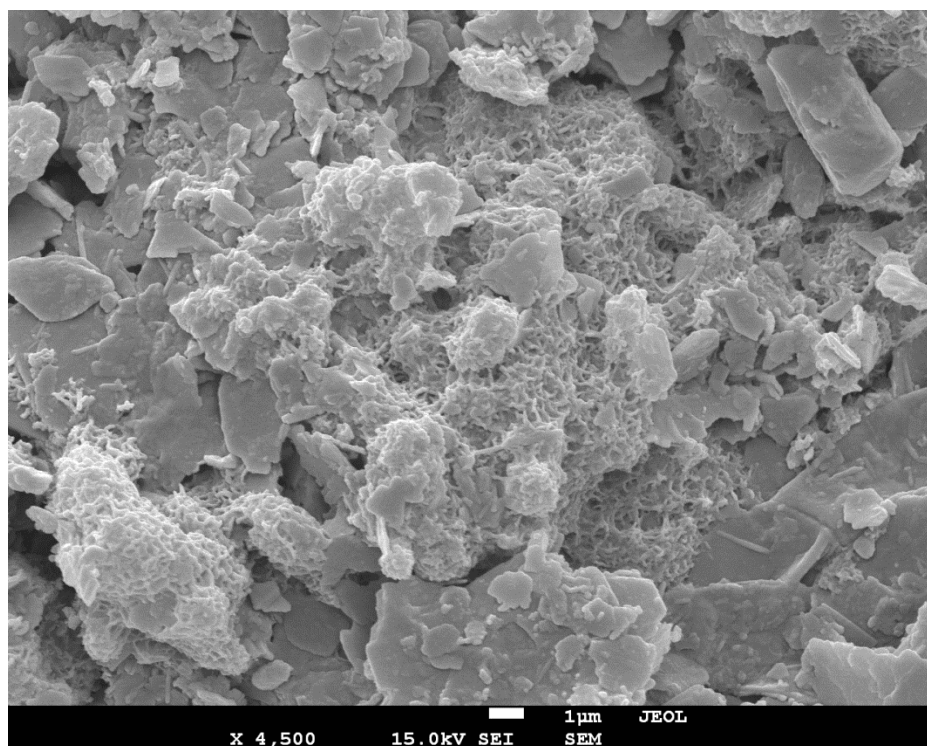


Figura 3.1. Muestra tomada del sedimento ferruginoso del agua que mana de la Mina Pepito.

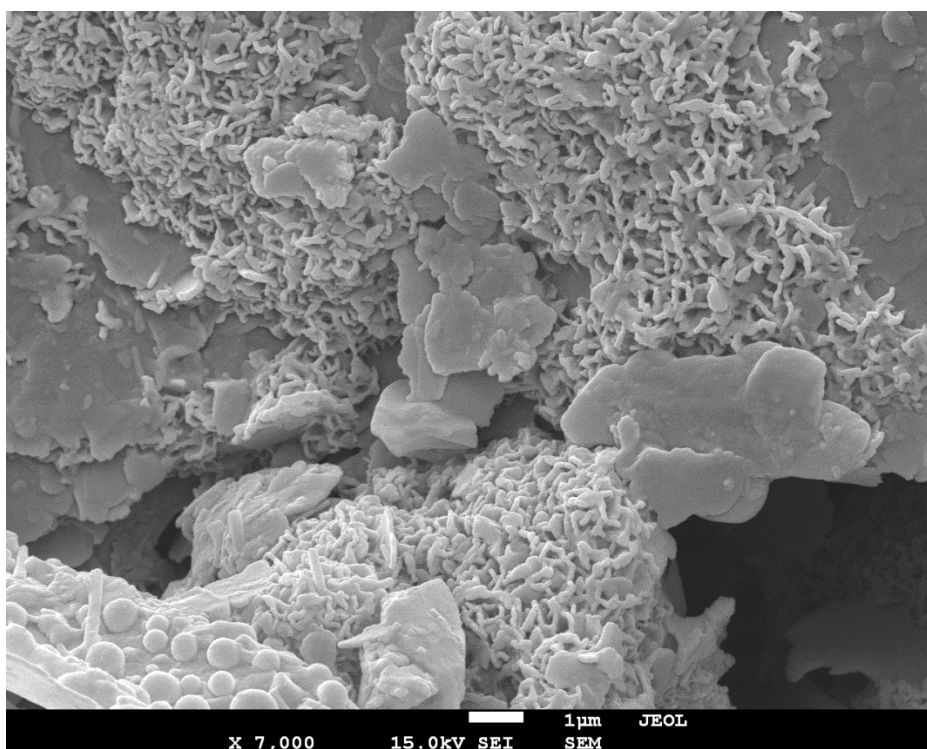


Figura 3.2. Sedimento ferruginoso del agua que mana de la Mina Pepito. Se observan bacterias filamentosas oxidantes del hierro.

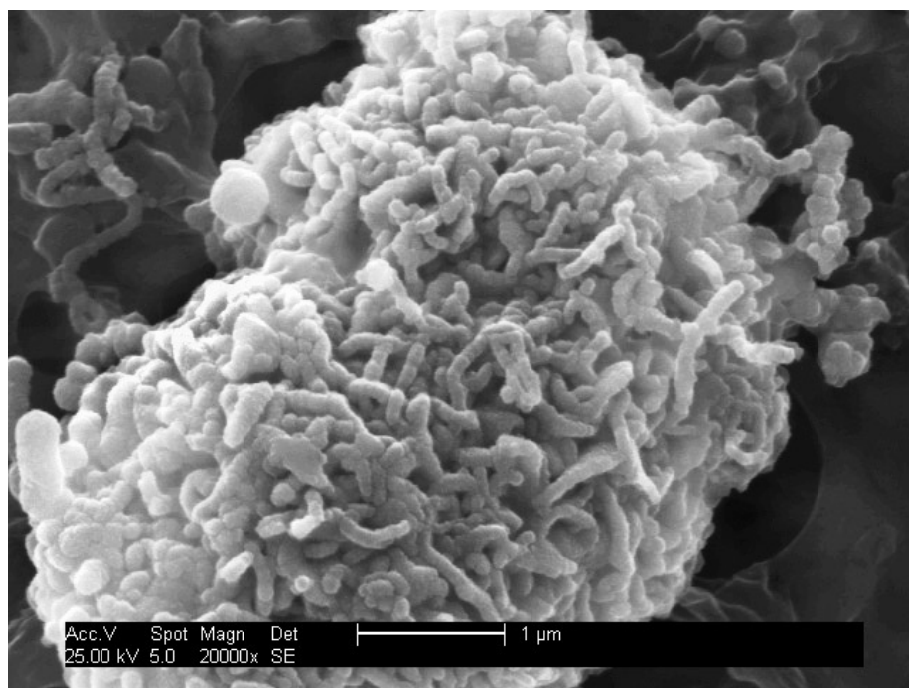


Figura 3.3. Bacterias filamentosas oxidante del hierro en la conducción de un pozo de agua subterránea. (http://www.sedimentaryores.net/Pipe%20Scales/Fe_Mn%20oxidizers.html).

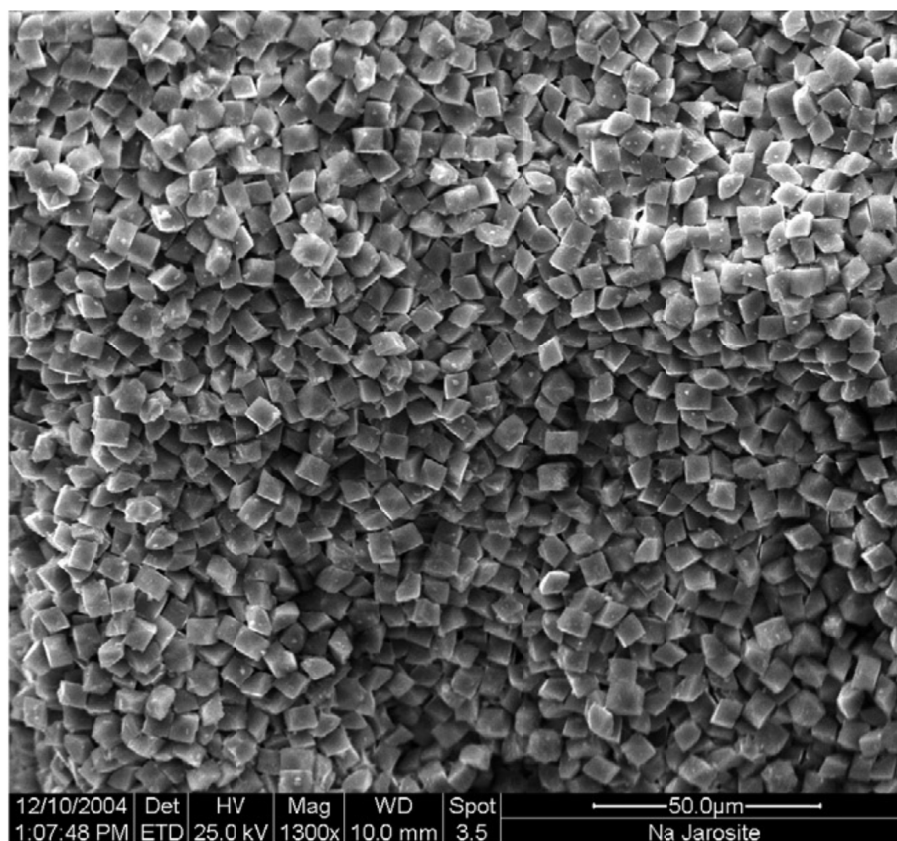
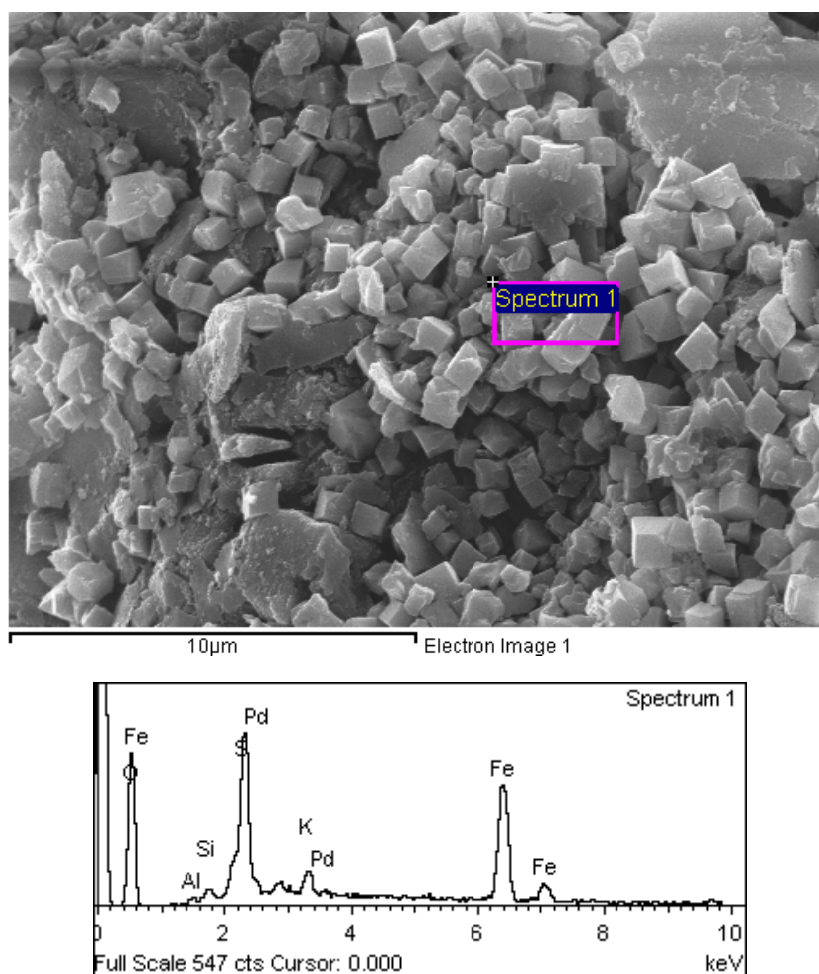


Figura 3.4. Imagen SEM de jarosita potásica (Frost et al., 2007)



Element	App Conc.	Intensity Corrn.	Weight%	Weight% Sigma	Atomic%
O K	1.67	1.3063	25.28	0.68	50.95
Al K	0.02	0.7796	0.40	0.10	0.48
Si K	0.04	0.8852	0.81	0.15	0.93
S K	0.64	0.9995	12.62	0.44	12.69
K K	0.17	1.1196	2.97	0.27	2.45
Fe K	2.51	0.9097	54.45	0.88	31.44
Pd L	0.14	0.7803	3.48	0.69	1.06
Totals			100.00		

Figura 3.5. Jarosita en los sedimentos de la orilla del lago de la Peña del Hierro y análisis por EDS.

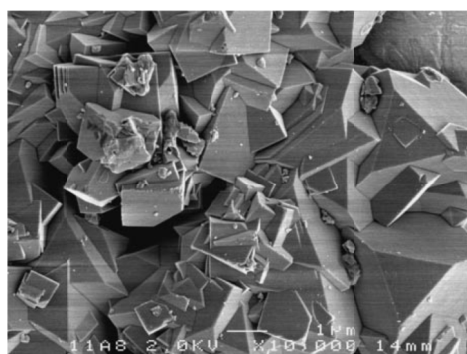


Figura 3.6. Imagen FESEM de amoniojarosita formada mediante la acción de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre arsenopirita (Sasaki et al., 2006).

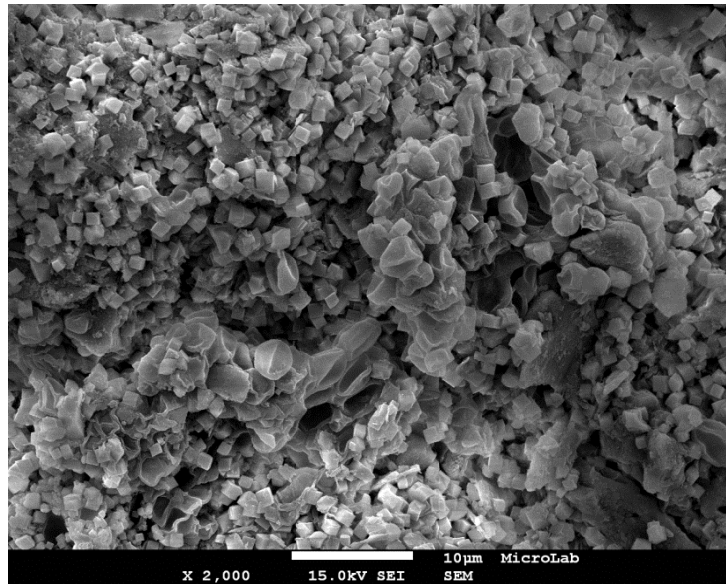


Figura 3.7. Jarosita y células colapsadas del alga *Cyanidium caldarium*.

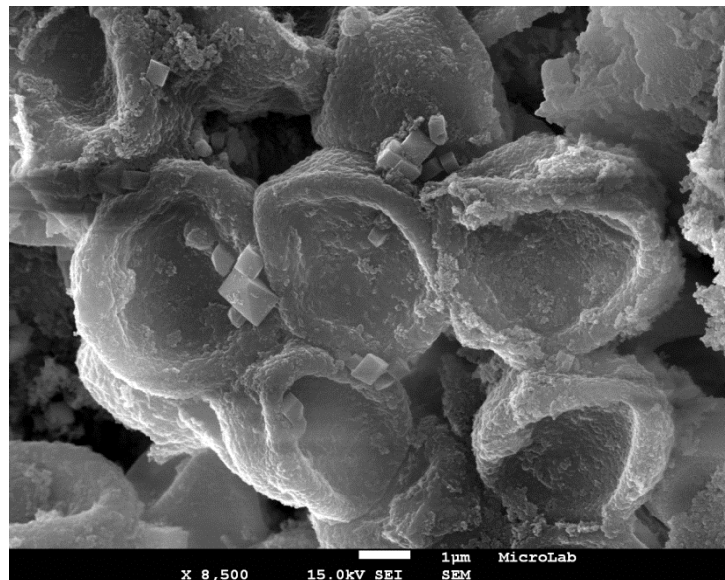


Figura 3.8. Células de *Cyanidium caldarium* (5 µm) y cristales de jarosita.

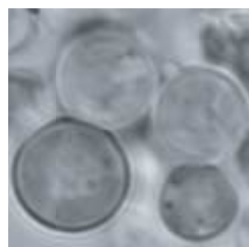
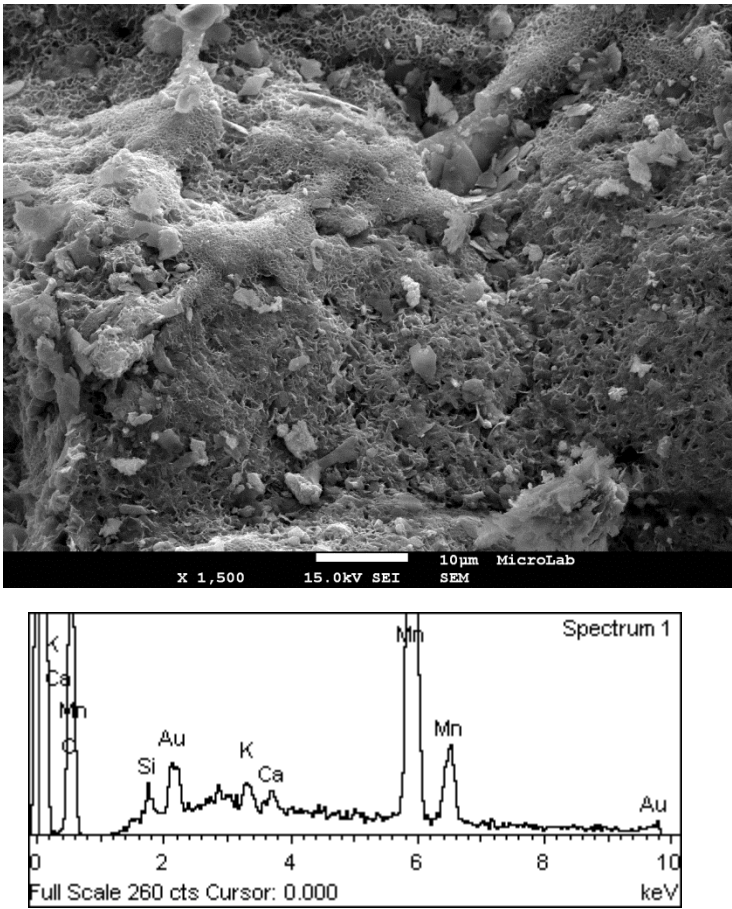


Figura 3.9. *Cyanidium* spp. en un nicho endolítico (calcedonia del Norris Geyser Basin, Yellowstone National Park, USA). Las células tienen un tamaño medio de 5 µm (Walker et al., 2005).

Según Vodyanitskii et al. (2004) los óxidos de manganeso en el suelo se subdividen en tres grupos, según su estructura: laminar o pseudolaminar, híbrido (capas mezcladas) o estructuras en túneles. El primer tipo incluye la birnesita y venardita, el segundo corresponde a la litioforita y el tercer grupo incluye la todorokita y el criptomelano. Los óxidos de estructura laminar o pseudolaminar parecen ser los más estables y los de estructura en túnel los más inestables.

Para reconocer la estructura de la birnesita, el óxido de manganeso más común en la naturaleza, se recogió una roca negra en la escombrera de Mina Pepito. Su estudio al FESEM permitió distinguir su característica estructura laminar, como se muestra en la Figura 3.10.



Element	App Conc.	Intensity Corrn.	Weight%	Weight% Sigma	Atomic%
O K	1.64	1.7721	15.37	0.43	38.94
Si K	0.05	0.9051	1.00	0.13	1.45
K K	0.09	1.2213	1.24	0.19	1.29
Ca K	0.06	1.1775	0.83	0.19	0.84
Mn K	4.40	0.9566	76.54	0.68	56.45
Au M	0.22	0.7469	5.01	0.58	1.03
Totals			100.00		

Figura 3.10. Birnesita sobre la superficie de una roca con costra negra en la escombrera de la Mina Pepito y análisis EDS.

El análisis del campo de la imagen FESEM por EDS mostró la presencia mayoritaria de óxido de manganeso. En las Figuras 3.11 y 3.12 se muestran otras zonas de la roca cuya superficie está prácticamente recubierta de birnesita.

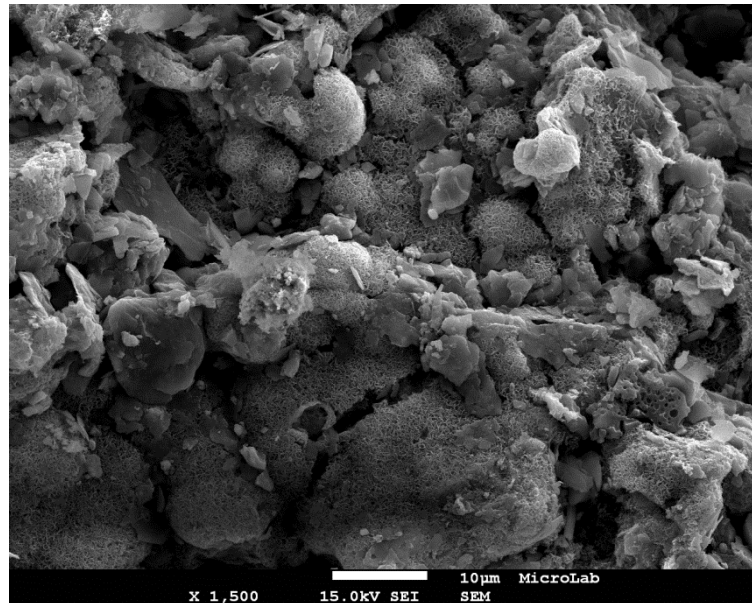


Figura 3.11. Otro aspecto de la superficie de la roca con costra negra de la Mina Pepito.

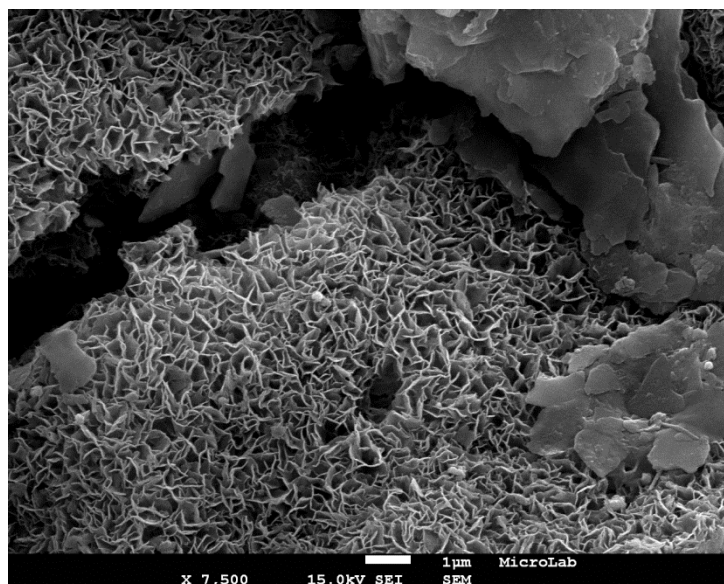


Figura 3.12. Estructura laminar de la birnesita a mayor aumento. Roca con costra negra de la Mina Pepito.

Un aspecto a resaltar de esta roca de manganeso, es que no solamente su superficie presentaba birnesita, sino que también se pudieron observar filamentos microbianos, de origen fúngico a juzgar por su tamaño, recubiertos por una densa vaina de manganeso, como muestran las Figuras 3.13 y 3.14. Ello apunta a la existencia de un proceso biogénico en la deposición de manganeso, en la escombrera de la Mina Pepito.

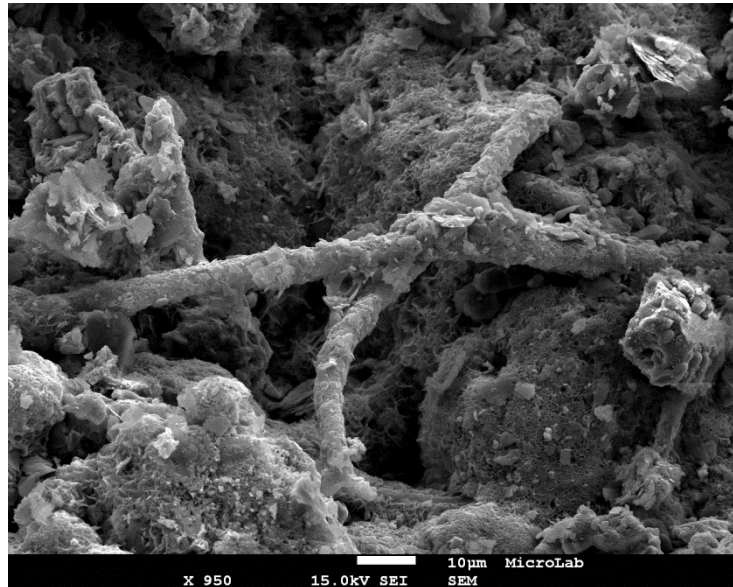


Figura 3.13. Filamentos microbianos de origen fúngico mineralizados.



Figura 3.14. Detalle de un filamento densamente mineralizado.

3.2. Síntesis de birnesita en el laboratorio

Con el fin de tener en el laboratorio un óxido de manganeso modelo, se sintetizó birnesita por el método de Oaki e Imai, (2007) y por otro desarrollado en nuestro laboratorio. Para conocer la estructura de la birnesita se procedió a su estudio al FESEM. La birnesita que se presenta en la Figura 3.15 se obtuvo mediante reacción con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), proceso que acortó significativamente el tiempo de obtención con respecto al método descrito por Oaki e Imai (2007). En la imagen se aprecia también una estructura laminar, aunque mucho más suelta que la de origen natural (Figuras 3.11 y 3.12). La estructura de nuestra birnesita sintética es muy similar a la publicada por Qin et al. (2016) cuando usó una razón molar $\text{MnSO}_4/\text{EDTA-Na}$ de 1 (Figuras 3.16 y 3.17).

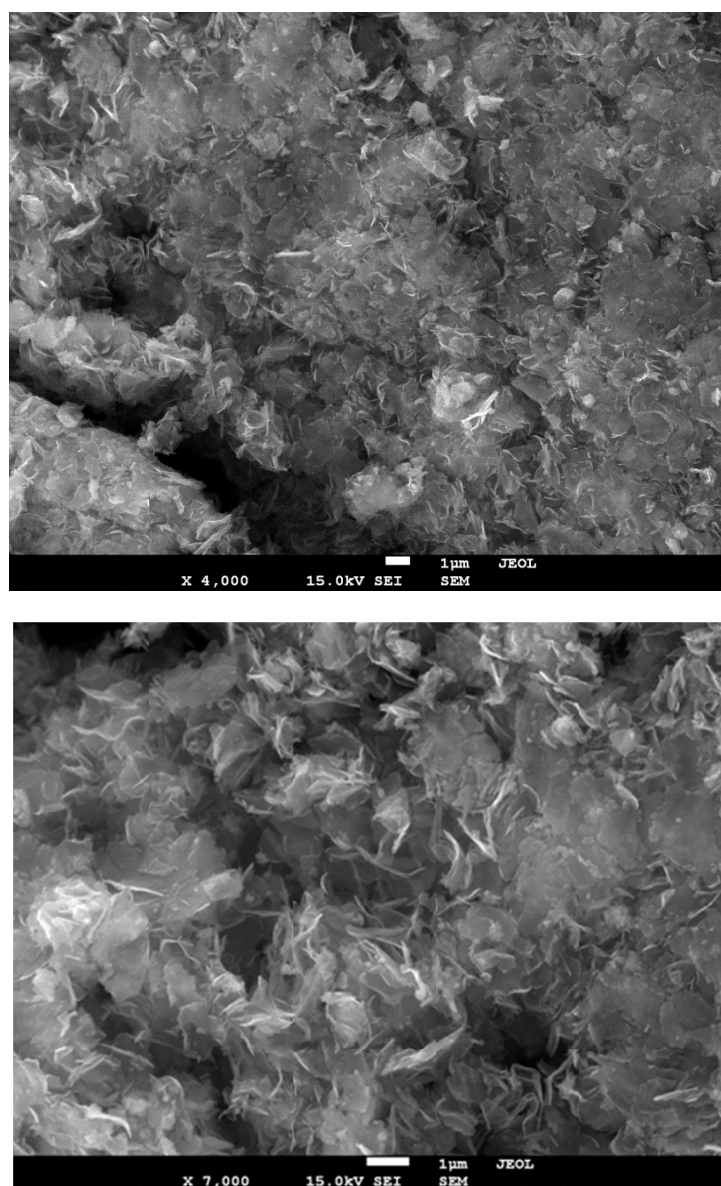


Figura 3.15. Imágenes FESEM de birnesita sintética obtenida por reacción de MnCl_2 con H_2O_2 .

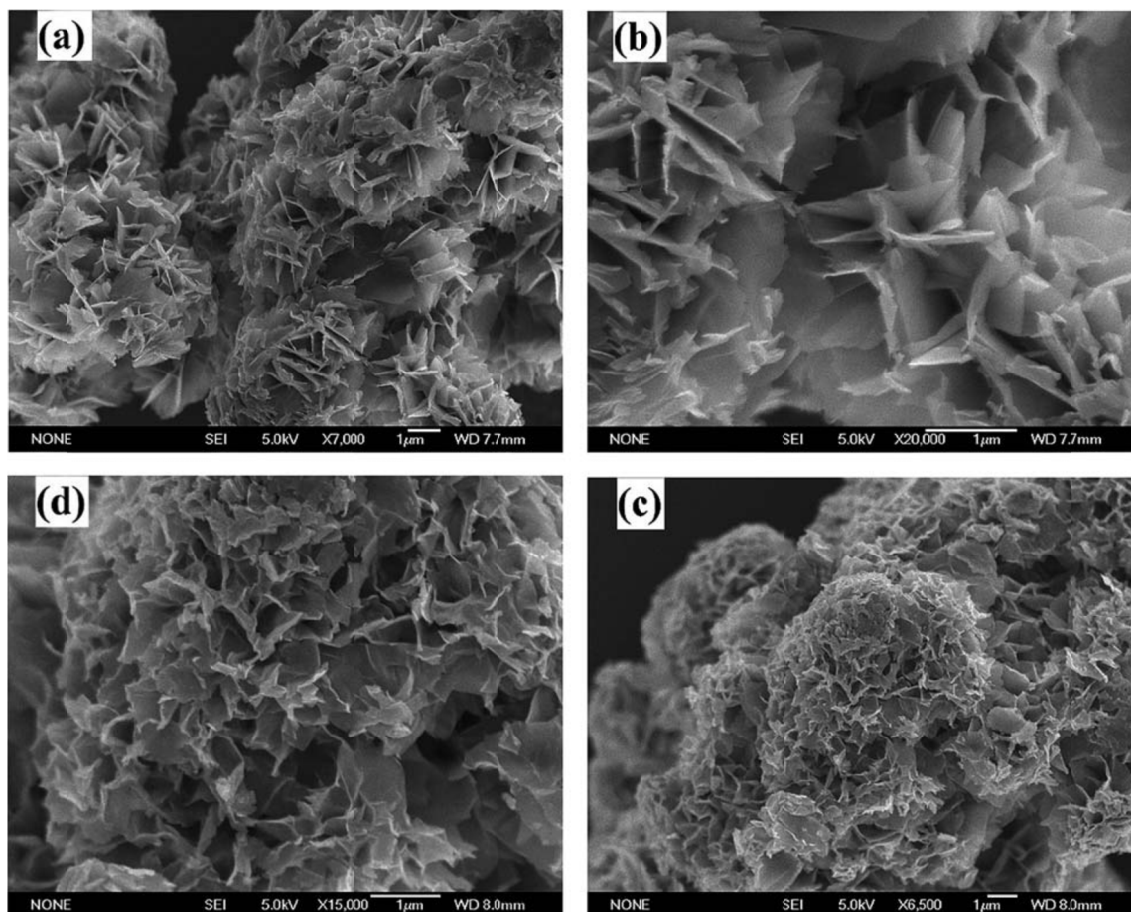


Figura 3.16. Birnesita sintética preparada por Qin et al. (2016), con razón molar $\text{MnSO}_4/\text{EDTA-Na}$ de 1 (a y b) y razón molar 2 (c y d).

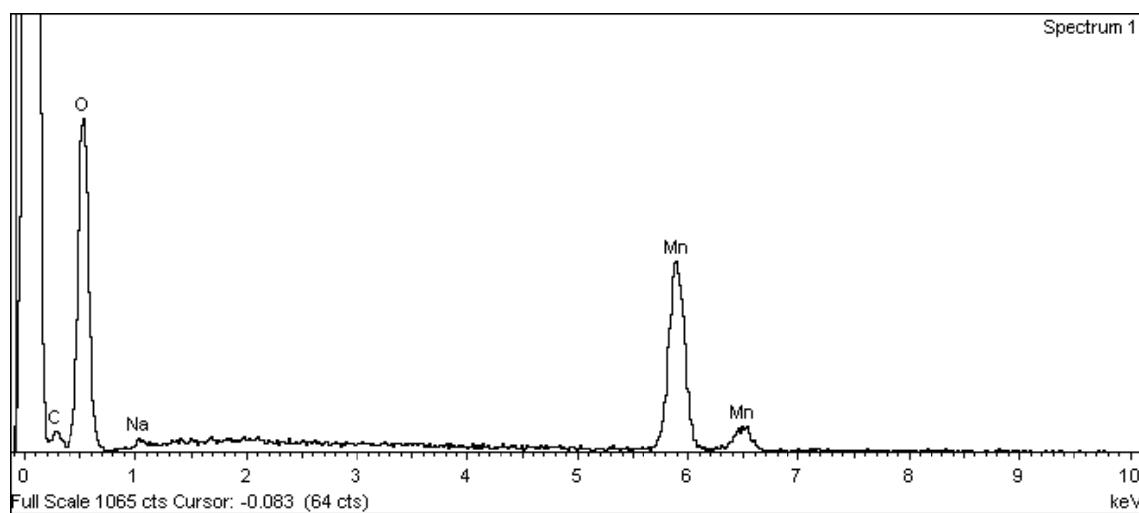


Figura 3.17. Espectro EDS de birnesita sintética obtenida por reacción de MnCl_2 con H_2O_2 .

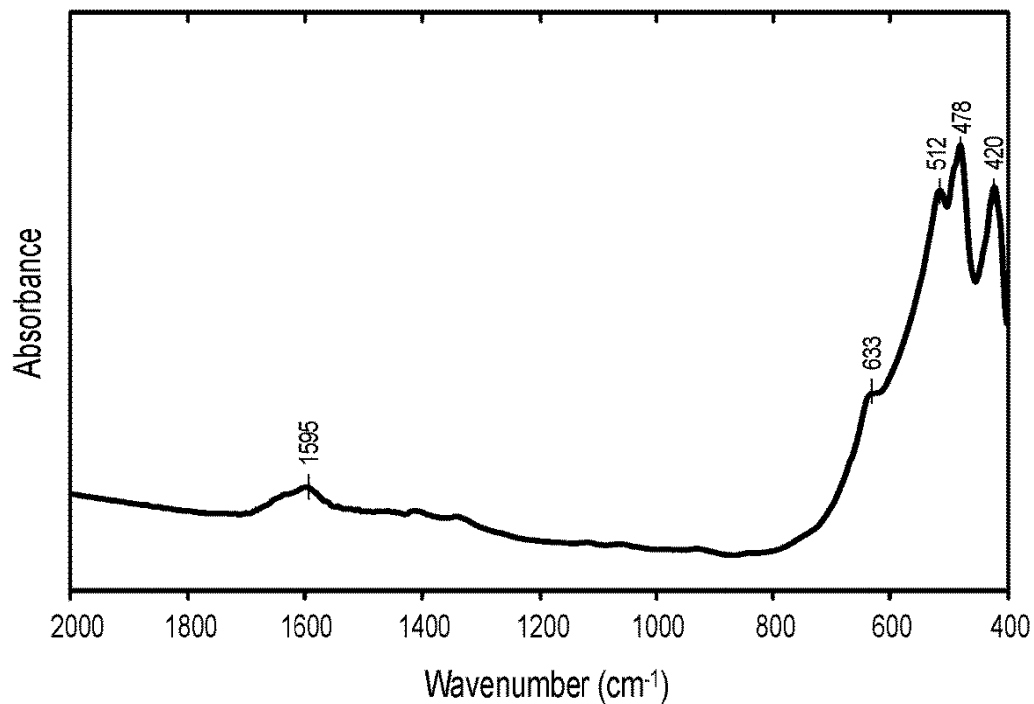


Figura 3.18. Espectro FTIR de birnesita sintética.

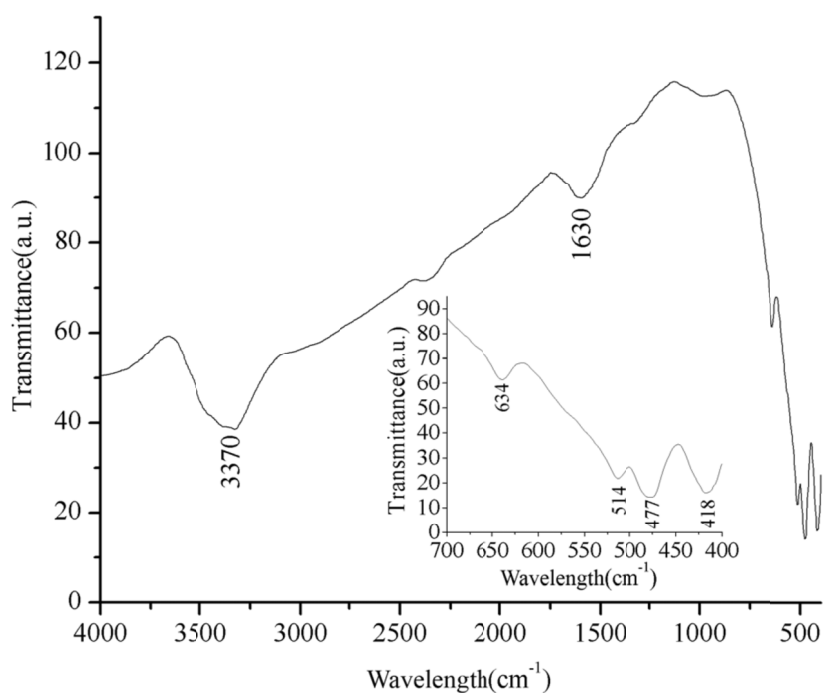


Figure 3.19. Espectro FTIR de birnesita (Qin et al. 2016)

El espectro de la birnesita sintética (Figura 3.18) muestra una banda a 1595 cm^{-1} que ha sido atribuida a vibraciones de grupos O–H. En la región 700-400 cm^{-1} aparecen cuatro bandas situadas a 633, 512, 478 y 420 cm^{-1} , que coinciden con las bandas del espectro de birnesita sintética obtenida por Qin et

al. (2016) a 634, 514, 477 y 415 cm^{-1} (Figura 3.19). Los dos picos a 514 y 477 cm^{-1} corresponden a vibraciones del Mn–O y son característicos en los espectros IR de birnesita, donde concretamente el pico a 514 cm^{-1} se debe a la estructura octahédrica del MnO_6 . Estos dos picos la diferencian de otros óxidos de manganeso, como la venardita, que lo presenta a 500 and 435 cm^{-1} , o de la todorokita (Potter y Rossman, 1979).

3.3. Aislamiento de hongos y ensayo para evaluar la capacidad de oxidar minerales de manganeso

Una vez comprobado que en la FPI se producen procesos de biogénesis de distintos minerales, el trabajo se centró en la búsqueda de hongos capaces de oxidar el manganeso. Para ello se inocularon una serie de muestras en placas de Petri con diferentes medios sólidos, entre ellos el medio AY modificado por Miyata et al. (2004) y el medio dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC).

Dado el elevado número de muestras y placas con los que se trabajó, solo se incluyeron en esta tesis los resultados relevantes que dieron lugar al aislamiento de hongos de interés, ya que en las placas crecieron también algunas bacterias. Las bacterias tienen una demostrada capacidad de oxidar el manganeso, tema que ya ha sido discutido en un importante número de publicaciones (Greene y Madgwick, 1991; Mandernack et al. 1995; Villalobos et al. 2003; Tebo et al. 2005, 2010; Jiang et al. 2010; Spiro et al. 2010; Sujith y Bharathi, 2011), por lo que no serán objeto de estudio en esta tesis.

En el primer muestreo, efectuado el 27 de noviembre de 2012 se sembraron placas con medio AY y manganeso. Se aislaron e identificaron 10 cepas de hongos (Tablas 3.1 y 3.2), de las que sólo dos (*Ascochyta* sp. y *Bartalinia robillardoides*) resultaron tentativamente positivas para el manganeso, ya que el oscurecimiento del medio pudiera resultar de otras causas, no necesariamente de la oxidación del manganeso (Figuras 3.20 a 3.22). Estos dos hongos se retuvieron para posteriores estudios. El resto de cepas resultaron negativas, como por ejemplo *Cladosporium sinuosum*, que se muestra en la Figura 3.23. Destaca el elevado número de levaduras negras aisladas (*Exophiala* spp., *Cladophialophora* sp. y *Coniosporium* sp.), que representan el 50% de los aislamientos.

Dado el bajo número de hongos aislados que resultaron inicialmente positivos, se decidió efectuar un segundo muestreo, el 25 de abril de 2013, ampliándose el número de localizaciones muestreadas, no necesariamente relacionadas con el manganeso, sino con otros minerales comunes en la FPI, como la jarosita, la melanterita, etc.

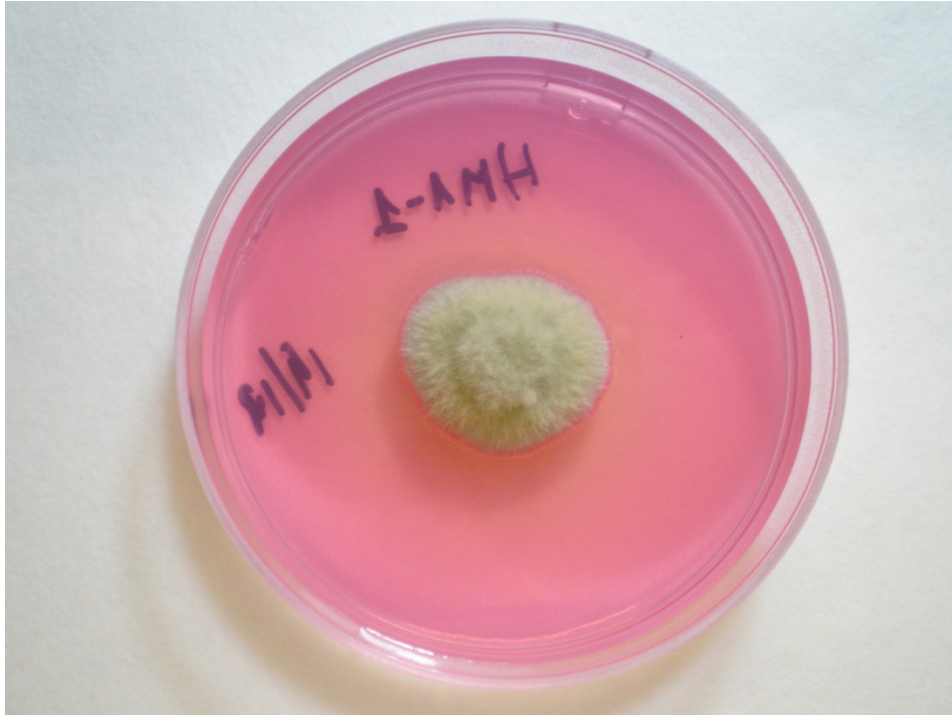


Figura 3.20. *Ascochyta* sp. en medio dicloran rosa de bengala cloranfenicol.

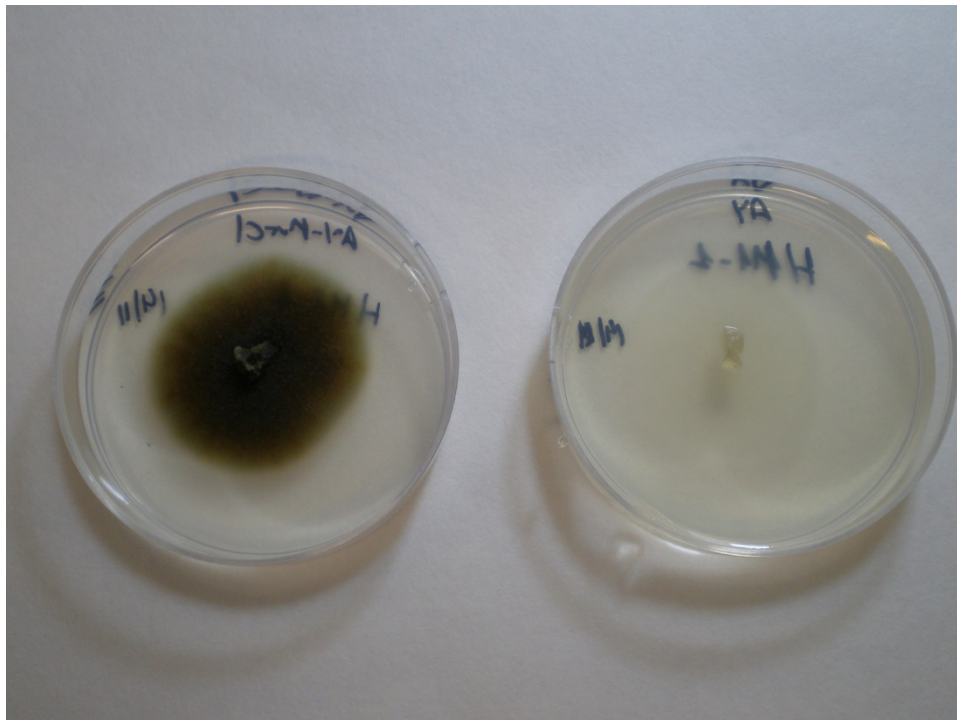


Figura 3.21. *Ascochyta* sp. en medio AY con manganeso (izquierda) y sin manganeso (derecha). Reacción positiva.

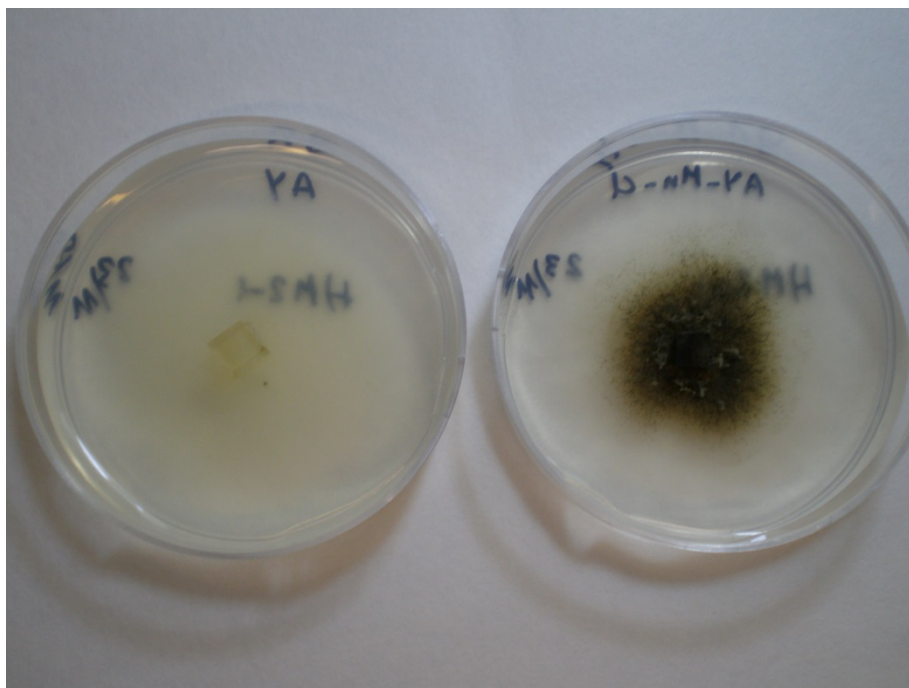


Figura 3.22. *Bartalinia robillardoides* en medio AY sin manganeso (izquierda) y con manganeso (derecha). Reacción positiva.

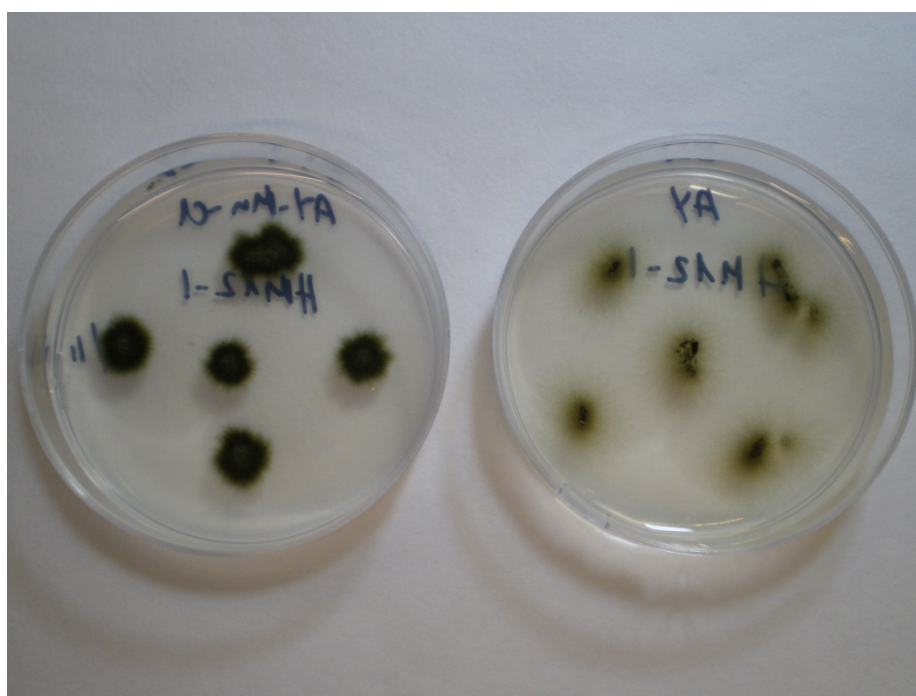


Figura 3.23. *Cladosporium sinuosum* en medio AY con manganeso (izquierda) y sin manganeso (derecha). Reacción negativa.

Tabla 3.1. Código de la cepa del hongo, procedencia y medios de cultivo empleados en el muestreo de 27 de octubre de 2012.

Código cepa	Procedencia	Lugar de muestreo	Medios de cultivo para aislamiento
HM1.1	Mina Pepito	Parte más antigua de escombrera	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
HM2.1	Mina Pepito	Roca en el cauce del agua de la mina	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
HM2.2	Mina Pepito	Roca en el cauce del agua de la mina	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
HM3.1	Mina Cobullos	Roca cerca de la escombrera	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
HM5.1	Mina Cobullos	Veta en el interior de la galería	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
HM10.1	Mina Soloviejo	Entorno de corta a cielo abierto	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
HM11.1	Mina Poderosa	Corta a cielo abierto	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
HM11.2	Mina Poderosa	Corta a cielo abierto	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
HM11.3	Mina Poderosa	Corta a cielo abierto	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
HM12.1	Mina Poderosa	Corta a cielo abierto	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)

Tabla 3.2. Identificación de hongos aislados en el muestreo de 27 de octubre de 2012.

Código cepa	Procedencia	Homólogo cultivado más cercano ¹	Similitud %	Reacción Mn
HM1.1	Mina Pepito	<i>Ascochyta</i> sp. (KT269133)	96	Positiva
HM2.1	Mina Pepito	<i>Bartalinia robillardoides</i> (NR_126145)	100	Positiva
HM2.2	Mina Pepito	<i>Coniosporium</i> sp. (AM279682)	93	Negativa
HM3.1	Mina Cobullos	<i>Devriesia</i> sp. (HQ914861)	87	Negativa
HM5.1	Mina Cobullos	<i>Cladophialophora</i> sp. (AB986426)	89	Negativa
HM10.1	Mina Soloviejo	<i>Exophiala spinifera</i> (KT192557)	100	Negativa
HM11.1	Mina Poderosa	<i>Cladosporium ramotenellum</i> (KX674646)	99	Negativa
HM11.2	Mina Poderosa	<i>Exophiala xenobiotica</i> (KX982232)	100	Negativa
HM11.3	Mina Poderosa	<i>Exophiala spinifera</i> (KT192557)	99	Negativa
HM12.1	Mina Poderosa	<i>Cladosporium sinuosum</i> (KX674647)	100	Negativa

¹Identificación por comparación con las cepas depositadas en la base de datos de NCBI y/o Mycobank y número de acceso.

En este segundo muestreo, el número de cepas de hongos que inicialmente parecían oxidar el manganeso aumentó a 10, cinco veces más que en primer muestreo. Además se incluyó en el estudio una cepa de *Acremonium nepalense*, aislado de la cueva de Lascaux, Francia, que anteriormente había mostrado su capacidad para oxidar manganeso (Saiz-Jimenez et al., 2012), y que se consideró como hongo modelo, de utilidad para este estudio (Tablas 3.3 y 3.4).

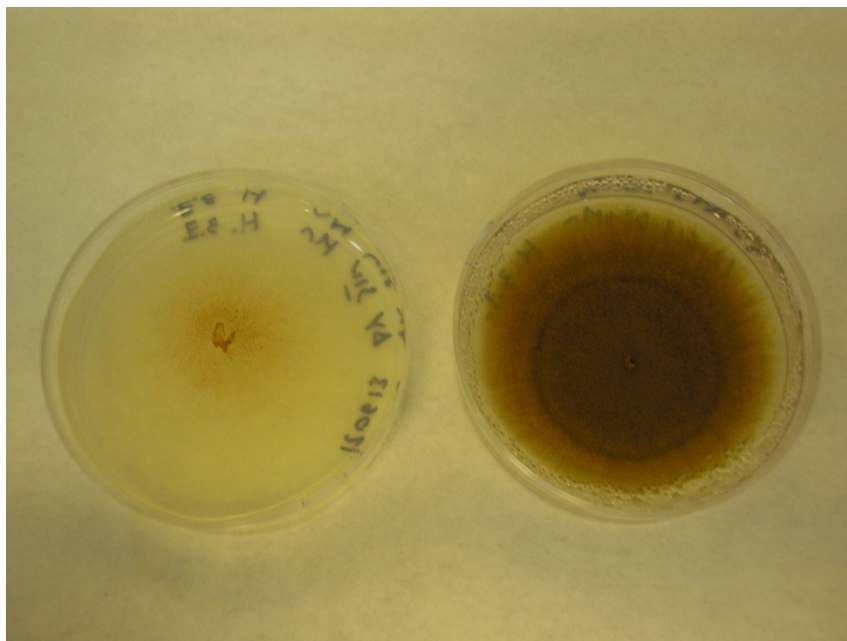


Figura 3.24. *Acrostalagmus luteoalbus* en medio AY sin manganeso (izquierda) y con manganeso (derecha). Reacción positiva.

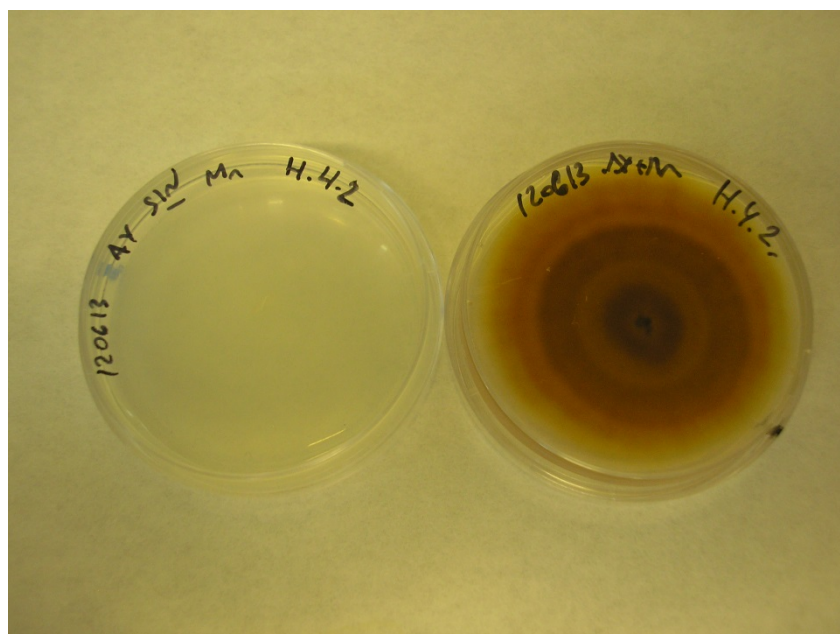


Figura 3.25. *Pseudopithomyces chartarum* en medio AY sin manganeso (izquierda) y con manganeso (derecha). Reacción positiva.

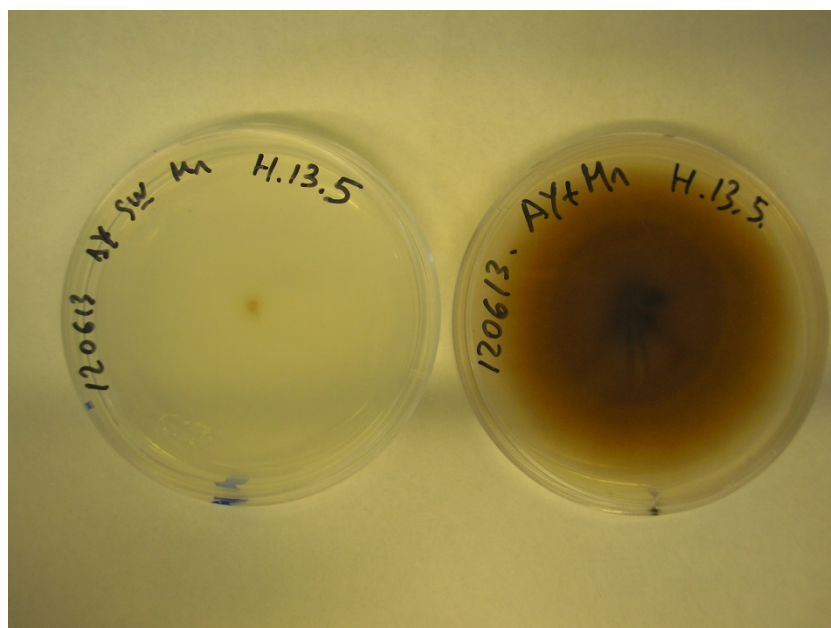


Figura 3.26. *Paraphaeosphaeria* sp. en medio AY sin manganeso (izquierda) y con manganeso (derecha). Reacción positiva.

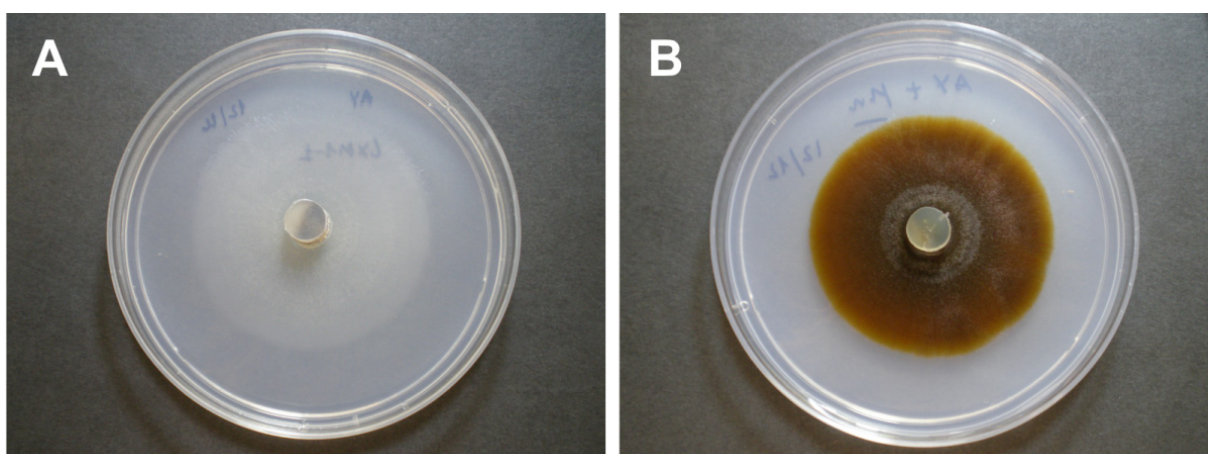


Figura 3.27. *Acremonium nepalense* en medio AY sin manganeso (izquierda) y con manganeso (derecha), (Saiz-Jimenez et al., 2012). Reacción positiva.

En la segunda campaña, el número de levaduras negras también fue importante (cinco) comprendiendo dos cepas de *Exophiala pisciphila* y dos de *Acidiella bohémica*, más *Phialophora americana* (23% del total). *Acidiella bohémica* es una especie de suelos extremadamente ácidos (Hujsllová et al., 2013) y fue aislada de la Mina Poderosa y el dique de San Platón. Una secuencia aislada del río Tinto presentó con ella una similitud del 98% (Amaral Zettler et al., 2002; (Hujsllová et al., 2013). Es también destacable el elevado número de hifomicetos dematiáceos aislados en ambos muestreos. Estos se

suelen asociar con los lugares de características más extremas (pHs más bajos y mayores concentraciones de metales (López-Archilla, 2005).

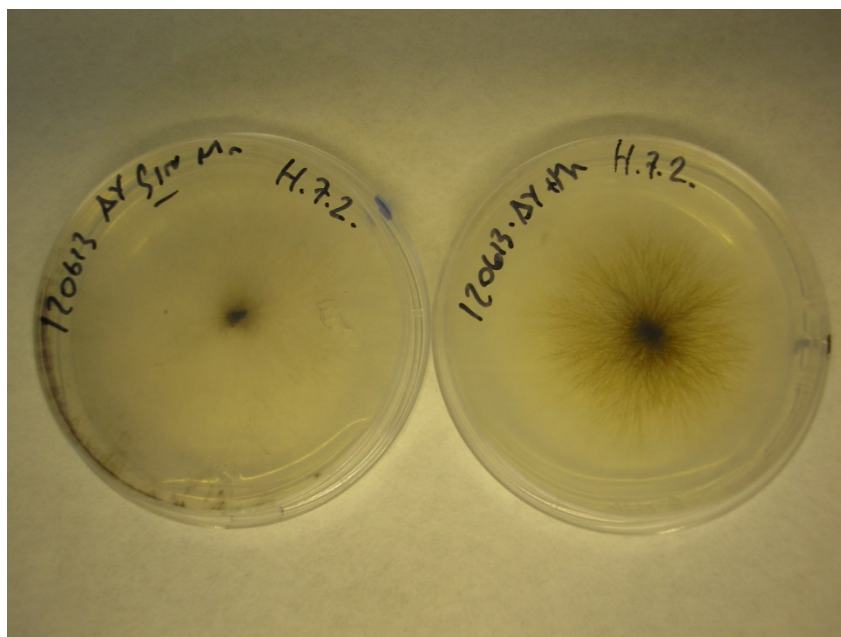


Figura 3.28. *Drechslera avenae* en medio AY sin manganeso (izquierda) y con manganeso (derecha). Reacción dudosa.

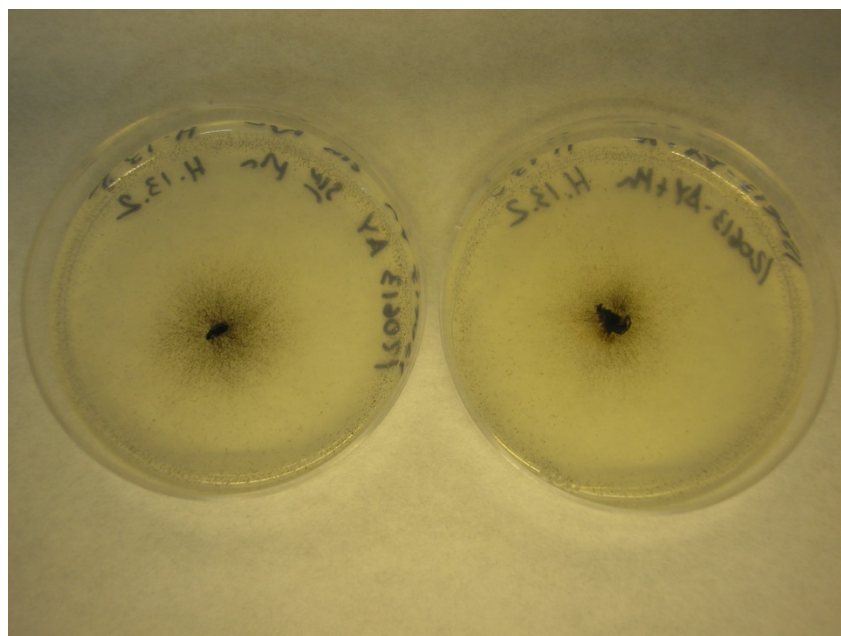


Figura 3.29. *Alternaria tenuissima*/A. *alternata* (MH0413_H13.2) en medio AY sin manganeso (izquierda) y con manganeso (derecha). Reacción negativa.

Tabla 3.3. Código de la cepa del hongo, procedencia y medios de cultivo empleados en el muestreo de 25 de abril de 2013.

Código cepa	Procedencia	Lugar de muestreo	Medio de cultivo para aislamiento
MH0413_H1.1	Mina Pepito	Material ferruginoso en fuente	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H2.1	Mina Pepito	Roca en el agua	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H3.3	Mina Pepito	Sedimento bajo puente	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H3.4	Mina Pepito	Sedimento bajo puente	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H4.1	Mina Pepito	Escombrera	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H4.2	Mina Pepito	Escombrera	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H4.3	Mina Pepito	Escombrera	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H4.4	Mina Pepito	Escombrera	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H5.1	Mina Pepito	Cauce cerca de la escombrera	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H5.2	Mina Pepito	Cauce cerca de la escombrera	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H5.4	Mina Pepito	Cauce cerca de la escombrera	DRBC
MH0413_H7.1	Peña del Hierro	Biofilm arroyo	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H7.2	Peña del Hierro	Biofilm arroyo	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H8.1	Mina Poderosa	Lodo amarillo hondonada	DRBC
MH0413_H10.2	Mina Poderosa	Cristales de melanterita	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H10.4	Mina Poderosa	Cristales de melanterita	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H13.2	Mina Poderosa	Cristales de melanterita	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H13.3	Mina Poderosa	Cristales de melanterita	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H13.4	Mina Poderosa	Cristales de melanterita	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H13.5	Mina Poderosa	Cristales de melanterita	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
MH0413_H16.2	Dique San Platón	Material negro	AY+Mn+cloranfenicol (Miyata et al., 2004)
LXM1.1 (control)	Cueva de Lascaux	Mancha negra	DRBC

Tabla 3.4. Identificación de hongos aislados en el muestreo de 25 de abril de 2013.

Código cepa	Procedencia	Homólogo cultivado más cercano ¹ (número de acceso)	Similitud %	Reacción Mn
MH0413_H1.1	Mina Pepito	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (KX958086)	100	Negativa
MH0413_H2.1	Mina Pepito	<i>Exophiala pisciphila</i> (NR_121269)	99	Negativa
MH0413_H3.3	Mina Pepito	<i>Acrostalagmus luteoalbus</i> (KT824244) ²	93	Positiva
MH0413_H3.4	Mina Pepito	<i>Acrostalagmus luteoalbus</i> (KT824244) ²	93	Positiva
MH0413_H4.1	Mina Pepito	<i>Myrothecium gramineum</i> (KJ780796)	98	Positiva
MH0413_H4.2	Mina Pepito	<i>Pseudopithomyces chartarum</i> (KU727797)	99	Positiva
MH0413_H4.3	Mina Pepito	<i>Pseudopithomyces chartarum</i> (KU727797)	99	Positiva
MH0413_H4.4	Mina Pepito	<i>Embellisia telluster</i> (FJ357316)	99	Negativa
MH0413_H5.1	Mina Pepito	<i>Pseudopithomyces chartarum</i> (KU727797) ³	99	Positiva
MH0413_H5.2	Mina Pepito	<i>Myrothecium gramineum</i> (KJ780796)	98	Positiva
MH0413_H5.4	Mina Pepito	<i>Phialophora americana</i> (EU514693)	99	Negativa
MH0413_H7.1	Peña del Hierro	<i>Alternaria tenuissima</i> (KX349880)/ <i>A. alternata</i>	100	Positiva
MH0413_H7.2	Peña del Hierro	<i>Drechslera avenae</i> (AF260328)	99	Dudosa
MH0413_H8.1	Mina Poderosa	<i>Acidiella bohémica</i> (JQ172757)	95	Negativa
MH0413_H10.2	Mina Poderosa	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (KX067796)	100	Negativa
MH0413_H10.4	Mina Poderosa	<i>Exophiala pisciphila</i> (NR_121269)	99	Negativa
MH0413_H13.2	Mina Poderosa	<i>Alternaria alternata</i> (KY398832)/ <i>A. tenuissima</i>	100	Negativa
MH0413_H13.3	Mina Poderosa	<i>Cladosporium cucumerinum</i> (KR912311)	100	Negativa
MH0413_H13.4	Mina Poderosa	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (KR912306)	100	Negativa
MH0413_H13.5	Mina Poderosa	<i>Paraphaeosphaeria</i> sp. (JX401954)	99	Positiva
MH0413_H16.2	Dique San Platón	<i>Acidiella bohémica</i> (JQ172757)	99	Negativa
LXM1.1 (control)	Cueva de Lascaux	<i>Acremonium nepalense</i> (HE605212)	97	Positiva

¹Identificación por comparación con las cepas depositadas en la base de datos de NCBI y/o Mycobank.

²Estas dos cepas alcanzaron un 93% de similitud con las cepas depositadas de la misma especie en la base de datos NCBI, por lo que fue posteriormente identificada mediante taxonomía clásica, confirmándose su asignación a la misma especie.

³Identificado como *Pithomyces chartarum* (KX664331), 99%, se opta por adscribirlo a *Pseudopithomyces chartarum*, ya que el primero es un sinónimo.

Tabla 3.5. Hongos con reacción de manganeso inicialmente positiva que se pasan a estudiar mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.

Código	Procedencia	Identificación	Reacción Mn
HM1.1	Mina Pepito	<i>Ascochyta</i> sp.	Positiva
HM2.1	Mina Pepito	<i>Bartalinia robillardoides</i>	Positiva
MH0413_H3.3	Mina Pepito	<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	Positiva
MH0413_H3.4	Mina Pepito	<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	Positiva
MH0413_H4.1	Mina Pepito	<i>Myrothecium gramineum</i>	Positiva
MH0413_H4.2	Mina Pepito	<i>Pseudopithomyces chartarum</i>	Positiva
MH0413_H4.3	Mina Pepito	<i>Pseudopithomyces chartarum</i>	Positiva
MH0413_H5.1	Mina Pepito	<i>Pseudopithomyces chartarum</i>	Positiva
MH0413_H5.2	Mina Pepito	<i>Myrothecium gramineum</i>	Positiva
MH0413_H7.1	Peña del Hierro	<i>Alternaria tenuissima/A. alternata</i>	Positiva
MH0413_H7.2	Peña del Hierro	<i>Drechslera avenae</i>	Dudosa
MH0413_H13.5	Mina Poderosa	<i>Paraphaeosphaeria</i> sp.	Positiva
LXM1.1 (control)	Cueva de Lascaux	<i>Acremonium nepalense</i>	Positiva

A continuación, se discuten brevemente las características tanto morfológicas como ecológicas de los hongos que presentan inicialmente reacción positiva con el manganeso.

3.4. Descripción de los géneros y especies con reacción inicialmente positiva al manganeso

El conocimiento de las características de cada género y/o especie aislada, así como su ecología, puede proporcionar una información importante sobre el comportamiento de cada cepa y ayudar a comprender su presencia en el nicho muestreado. Por ello a continuación se presenta una revisión de la información disponible en la literatura.

3.4.1. *Ascochyta* sp.

Se aisló una cepa HM1.1 en la escombrera de Mina Pepito, que se asignó a *Ascochyta* sp. no pudiéndose adscribir a una especie determinada al obtenerse un porcentaje de similitud del 96%, suficiente para determinar el género, pero no la especie.

El género *Ascochyta* se incluye dentro de los Deuteromycetes (Fungi Imperfecti). Las características básicas de este grupo son la ausencia de formas de reproducción sexual, son septados y producen numerosos conidios sobre diversos tipos de conidióforos, bien libres o como parte de estructuras especializadas.

Ascochyta es uno de los géneros de hongos imperfectos con un mayor número de especies descritas, 1100, desde su publicación como género en 1830 por Libert hasta la monografía de Mel'nik (1977). En la actualidad su número debe sobrepasar los 1500.

Sus especies son anamórficas de los géneros *Didymella*, *Mycosphaerella* y *Leptosphaeria* (ascomicetos) y son patógenos de numerosas plantas cultivadas y no cultivadas, correspondientes a más de 150 familias, entre las que las leguminosas y compuestas destacan por su mayor número de plantas huéspedes (más de 70 cada una), seguida de las gramíneas con más de 50. Muchas de las especies descritas se encontraron en el sur de Europa (Portugal España e Italia). Algunas especies producen grandes pérdidas económicas en los cultivos.

El género se caracteriza por producir picnidios sobre hojas, frutos, tallos y otras partes de las plantas huéspedes, inmersos, semi-inmersos o superficiales. Se han descrito especies sobre musgos, hepáticas, *Ranunculus*, y otras especies de hábitats acuáticos (Henricot, 2012). Los picnidios son globosos o lenticulares y los conidios predominantemente cilíndricos, ovalados, elipsoidales, fusiformes, entre otros. El estado perfecto del hongo corresponde al género *Didymella* (Mel'nik, 1977). En la Figura 3.30 se observa la producción de picnidios en placas de PDA con 2 meses de antigüedad.

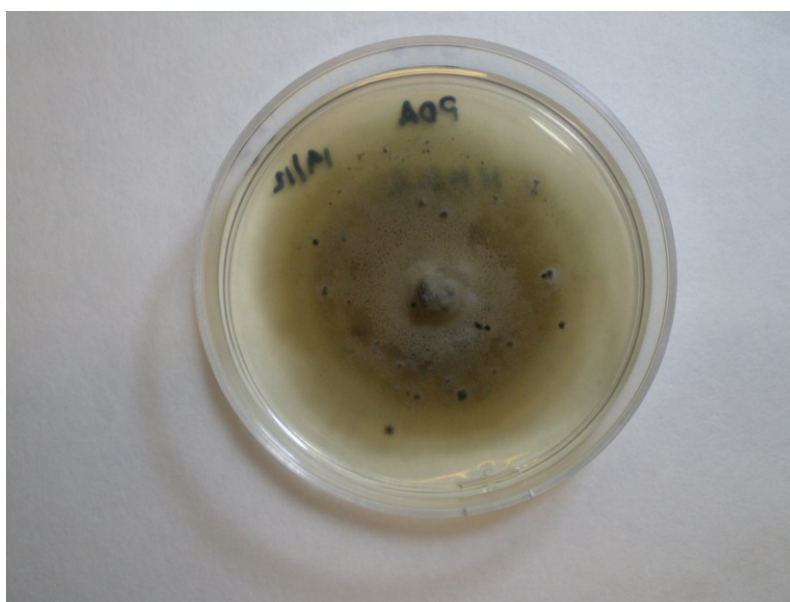


Figura 3.30. Picnidios en cultivo de *Ascochyta* sp. en medio PDA.

El hongo se caracteriza por producir manchas en las hojas de las plantas atacadas, que pueden extenderse por los márgenes u ocupar toda la hoja. El tamaño de las manchas de 1 a 2 mm de diámetro y de color variable, abundando el amarillo, gris, marrón o diferentes tonos blanquecinos.

En su monografía, Mel'nik (1977) incluye 21 nuevas especies descritas en España. La determinación de las especies se efectúa mediante el estudio de sus rasgos morfológicos, fundamentalmente forma y tamaño de los conidios. La consulta de la base de datos de secuencias no permitió determinar la especie aislada. Igualmente, en la literatura no apareció referencia alguna a la oxidación de manganeso por estos hongos.

3.4.2. *Bartalinia robillardoides*

La cepa HM2.1, aislada del cauce de agua que mana de la Mina Pepito, se asignó a la especie *Bartalinia robillardoides* (100% de similitud) que se incluye dentro de los Coelomycetes, y cuya especie tipo presenta picnidios globosos o sub-globosos, marrón oscuro, uniloculares, inmersos en las hojas de plantas muertas. Los conidios son hialinos, cilíndricos o fusiformes, con cuatro septos (Morgan-Jones et al., 1972).

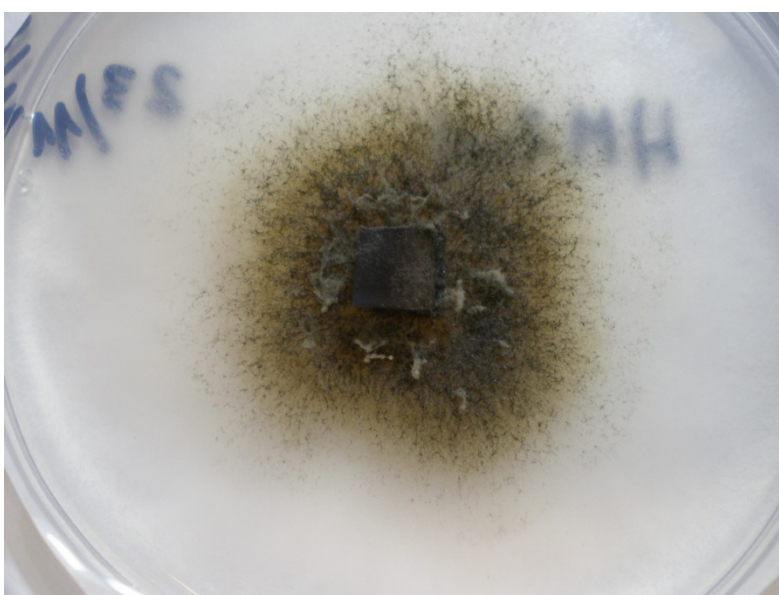


Figura 3.31. *Bartalinia robillardoides* en medio AY-Mn.

Roldán y Honrubia (1990) describieron esta especie como nueva para España y la aislaron de hojas de *Populus alba* sumergidas en el río Vinalopó (Alicante), siendo la primera vez que se encontraba en un medio acuático. En este río se detectó frecuentemente *Bartalinia robillardoides* sobre otros restos vegetales de

distinta procedencia, casi siempre en zonas de ribera con elevados índices de humedad. Ello coincide con la ecología de nuestra cepa, aislada de las aguas que mana de la boca mina Pepito. Gönczöl y Révay (2004) encontraron esta especie en el agua de lluvia recogida de arboledas y canalones en Hungría.

Roux y van Warmelo (1990) estudiaron el proceso de formación de los conidiomata encontrando que las hifas se alargaban y cruzaban para formar una enrevesada masa de hifas que se concentraban para iniciar la formación del conidioma.

No se ha encontrado referencia sobre la oxidación de manganeso por esta especie de hongo (Figura 3.31).

3.4.3. *Acrostalagmus luteoalbus*

Se aislaron dos cepas de esta especie (MH0413_H3.3 y MH0413_H3.4) de sedimentos del cauce de agua que mana de la Mina Pepito. La similitud del 97% las posicionaban como *Acrostalagmus luteoalbus* y esa asignación fue corroborada mediante estudio taxonómico efectuado por la Dra. Alena Nováková, Chequia (Figura 3.32).

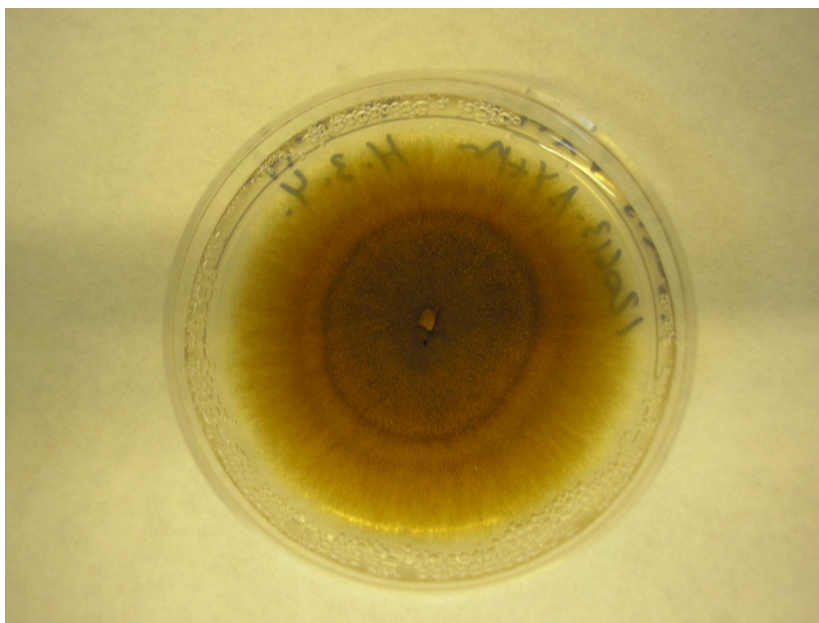


Figura 3.32. *Acrostalagmus luteoalbus* en medio AY-Mn.

La especie *Acrostalagmus luteoalbus* tiene varios sinónimos, fruto de los diferentes estudios efectuados a lo largo del tiempo. Inicialmente descrita como *Verticillium luteoalbum* (Hyphomycetes) es una especie común, saprofita y, a

menudo, micoparásita. Gams et al. (2005) propusieron la combinación *Acrostalagmus luteoalbus* para acomodar a *Verticillium luteoalbum*.

La especie ha sido aislada de una variedad de plantas y suelos (Mohammadi y Amini, 2015; Grum-Grzhimaylo et al., 2016), pero no existe cita sobre su comportamiento respecto al manganeso.

3.4.5. *Myrothecium gramineum*

De la escombrera y el cauce de agua de la Mina Pepito se aislaron dos cepas de *Myrothecium gramineum* (MH0413_H4.1 MH0413_H5.2), la primera de la escombrera y la segunda del cauce de agua cercana a la escombrera de Mina Pepito (Figura 3.33).

El género *Myrothecium* fue descrito por primera vez en 1790 por Tode y actualmente incluye más de 65 especies, muchas de ellas saprofitas. El género se ha prestado a controversias desde su creación y se considera como artificial y objeto de críticas, debido a la dificultad de delimitar morfológicamente este género de otros (De Maeseneire, 2007).

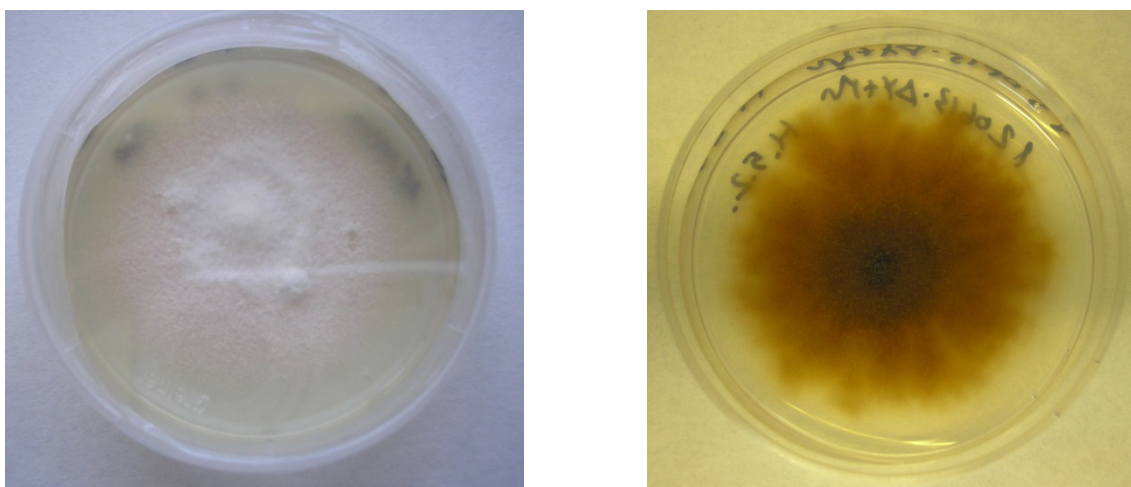


Figura 3.33. *Myrothecium gramineum* en medio AY sin Mn y con Mn.

El micelio de *Myrothecium gramineum* es blanco, de crecimiento denso, las hifas hialinas y septadas, los conidióforos compuestos de hifas fértiles y fiálidas. Las hifas fértiles son sub-hialinas, septadas, de color oliváceo, las fiálidas hialinas, rectas o flexuosas, los conidios sub-hialinos o verde pálido, ovalados de extremos redondeados (Preston, 1948). En la revisión de artículos sobre la ecología de esta especie no se han encontrado referencias sobre su comportamiento con el manganeso.

3.4.6. *Pseudopithomyces chartarum*

Se aislaron tres cepas, MH0413_H4.2, MH0413_H4.3 y MH0413_H5.1, las dos primeras de la escombrera de Mina Pepito y la tercera del cauce de agua que mana de la boca mina.

Pseudopithomyces chartarum tiene varios sinónimos: *Leptosphaerulina chartarum*, *Pithomyces chartarum* y *Sporidesmium bakeri*. De hecho, las cepas se identificaron en la base de datos como *Leptosphaerulina chartarum* con un 99% de similitud, aunque el nombre correcto es el aquí empleado. Es un hongo que se incluye en la familia Didymosphaeriaceae (Ascomycota).

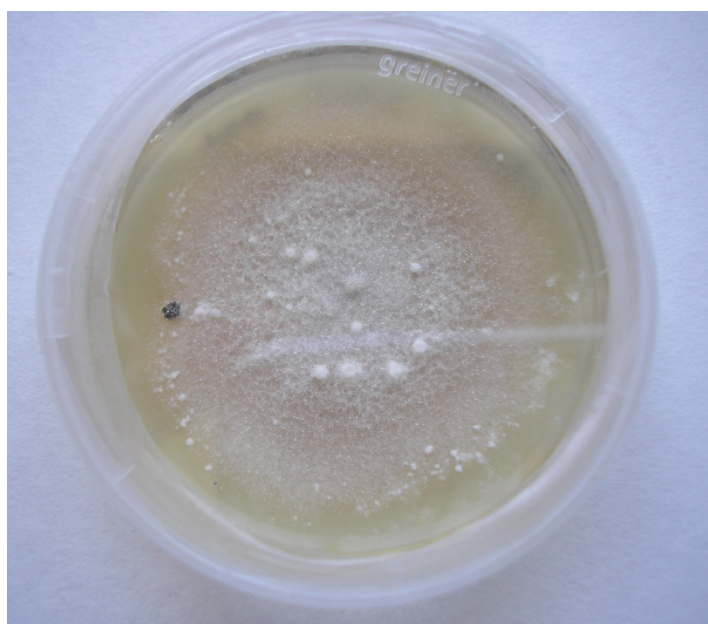


Figura 3.34. *Pseudopithomyces chartarum* en medio AY sin Mn.

En la descripción que efectúa Dingley (1962) de la especie indica que es cosmopolita, saprofita y se distribuye por las regiones templadas, subtropicales y tropicales del planeta. Aparece comúnmente en los pastos, donde se asocia a una enfermedad del ganado, el eczema facial, producida por el daño en el hígado que causa una micotoxina (esporidesmina) que produce el hongo (da Cunha et al., 2014).

Los conidios de la especie en medio de cultivo forman clusters de hasta 200 μm sobre una red de micelios ramificados y anastomosados. Los conidióforos son cortos, hialinos y no septados. Los conidios maduros suelen estar pigmentados (Figura 3.34). Las colonias en medios de cultivos aparecen diferenciadas en círculos concéntricos (ver Figura 3.25) que se cree debido a recombinaciones genéticas. En los medios de cultivo se pueden distinguir tres

tipos de micelios, uno con hifas hialinas, otro con hifas de paredes gruesas y marrón oscuro y la tercera con hifas equinuladas, también marrones. Esta morfología ha de tenerse en cuenta a la hora de valorar la reacción positiva o negativa en el medio AY-Mn.

Santelli et al. (2010) en un artículo sobre la bioremediación de las aguas de drenaje de minas de carbón cita el aislamiento de una cepa de *Pithomyces chartarum*, pero con una tolerancia baja (5 mM) al Mn^{2+} disuelto en las aguas frente a otras especies, como *Acremonium strictum*, *Alternaria alternata*, *Plectosphaerella cucumerina*, etc. que toleraban concentraciones superiores a los 10 mM.

Posteriormente, Tang et al. (2013) encontraron que *Pithomyces chartarum* acumulaba óxidos de manganeso sobre la superficie de sus hifas en forma de pequeños clusteres esféricos, pero también sobre la superficie de encontraron una cantidad substancias de rodocrosita ($MnCO_3$) adyacente a las hifas.

3.4.7. *Alternaria tenuissima*/A. *alternata*

Se han aislado dos cepas de la especie *Alternaria tenuissima*/A. *alternata*, una de un biofilm del arroyo de la Peña del Hierro (MH0413_H7.1) y otra cristales de melanterita (MH0413_H13.2). La primera con un resultado aparentemente positivo para la oxidación del manganeso (Figura 3.35) y la segunda con resultado negativo (Figura 3.29). Se retuvo la primera cepa para su estudio al FESEM. No fue posible distinguir entre las dos especies de *Alternaria* al dar ambas un porcentaje de similitud del 100% con las secuencias depositadas en la base de datos.

El género está constituido por especies saprofitas y patógenos oportunistas de una gran variedad de plantas y cultivos. Su distribución es cosmopolita. Estas especies producen micotoxinas (alternariol, altertoxina, ácido tenuazonico, entre otros), asociados a alergia y asma en ambientes interiores. Ocasionalmente infecta a inmunodeprimidos (Robertshaw e Higgins, 2005).

No se ha encontrado referencia alguna sobre la oxidación del manganeso por *Alternaria tenuissima*, aunque Santelli et al. (2010) cita a *Alternaria alternata* como una especie resistente a concentraciones superiores a 10 mM de manganeso en medios de cultivo.

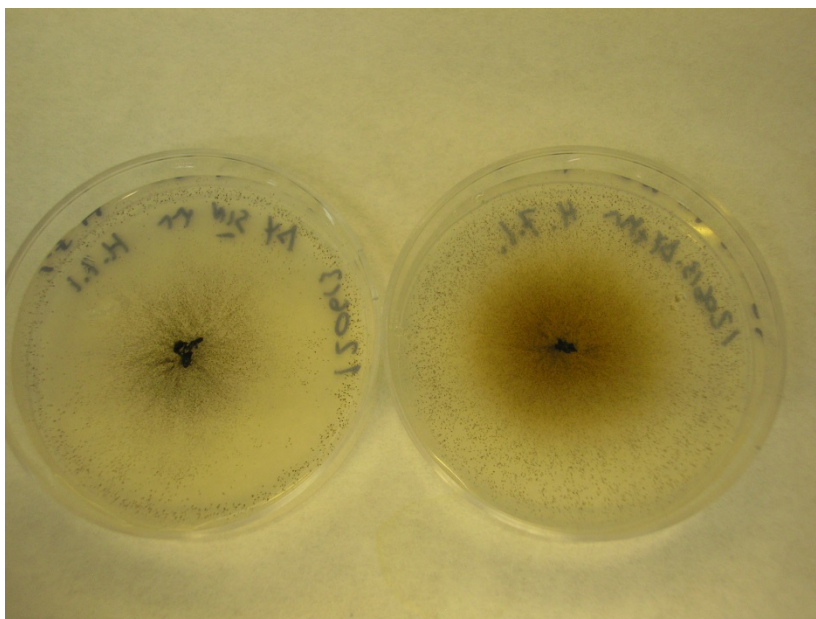


Figura 3.35. *Alternaria tenuissima*/*A. alternata* (MH0413_H7.1) con reacción de manganeso aparentemente positiva.

3.4.8. *Drechslera avenae*

La especie *Drechslera avenae* se aisló de un biofilm del arroyo de la Peña del Hierro (MH0413_H7.2) y se ha retenido para su estudio al dar los micelios una reacción con manganeso que se pudiera considerar dudosa (Figura 3.30).

La especie es el anamorfo de *Pyrenophora graminea*, con conidióforos individuales o en grupos de dos a cuatro, oscuros, septados. Conidios subhialinos o amarillo pálido, cilíndricos con ápice redondeado.

La especie es la causante de grandes pérdidas económicas en cultivos de gramíneas. Causa manchas en las hojas de avena y se ha aislado también de granos de trigo (Sheridan, 1977; Sisterna y Carranza, 2004). No se ha hallado referencia a la posible implicación de esta especie en el ciclo del manganeso.

3.4.9. *Paraphaeosphaeria* sp.

La cepa de *Paraphaeosphaeria* sp. (MH0413_H3.5) se aisló de cristales de melanterita en la Mina Poderosa (Figura 3.26).

El género *Paraphaeosphaeria* fue establecido por Eriksson en 1967 para acomodar las cepas segregadas de *Leptosphaeria* que poseían ascos y ascomata como en el género *Phaeosphaeria*, pero diferenciándose de este último por producir ascosporas marrones y con un anamorfo *Coniothyrium* sensu lato (Camara et al., 2001). La mayoría de las especies de este género se

han aislado de plantas, aunque (2001) aislaron *Paraphaeosphaeria quadrisepata* de la fachada de edificios y estatuas en Viena.

Takano et al. (2006) aislaron tres cepas de hongos que oxidaban manganeso en Japón, dos de las cuales fueron de un sedimento acuático rico en ese elemento. Estas se incluyeron en un cluster con especies de *Paraphaeosphaeria* y *Coniothyrium* (18S rRNA), aunque argumentaron que estas dos estaban aparentemente distantes de *Paraphaeosphaeria* ya que el árbol filogenético de los genes ITS1-5.8S rRNA-ITS2 situaba una especie en un cluster con *Coniothyrium* y otra en otro con *Paraconiothyrium*. Los autores indicaron que la capacidad para oxidar manganeso de especies de esos tres géneros era desconocida, aunque Marshall (1979) incluyó *Coniothyrium fuckelii* como oxidante del manganeso.

Takano et al. (2006) sugerían que existe un número de especies oxidantes del manganeso en algunos habitats acuáticos, por lo que argumentaban que la identificación de especies de estos hongos es de capital importancia para evaluar la importancia de los hongos en el ciclo biogeoquímico del manganeso.

3.4.10. *Acremonium nepalense*

La especie de *Acremonium nepalense* LXM1-1 se aisló de las manchas negras que amenazan las pinturas rupestres de la cueva de Lascaux en Francia. La oxidación de manganeso por esta especie fue descrita por Saiz-Jimenez et al. (2012), tanto en su medio natural como en el laboratorio (Figura 3.27), por lo que se utiliza en este estudio como hongo modelo oxidante del manganeso.

El género *Acremonium* incluye hongos filamentosos anamórficos de estructura simple. Su morfología se presenta como hifas septadas dando lugar a fiálidas septadas individuales o en pequeños grupos. Los conidios tienden a ser unicelulares, hialinos o melanizados, pero las hifas son usualmente hialinas (Summerbell et al. 2011).

En la literatura se han descritos otras especies de *Acremonium* implicadas en el ciclo del manganeso, como *A. strictum* (Santelli et al., 2010, 2011), y cepas no identificadas y denominadas como *Acremonium*-like (Cahyani et al. 2009). Grangeon et al. (2010) estudiaron la estructura cristalina de óxidos de manganeso biogénicos producidos por una especie sin identificar de *Acremonium* sp. encontrando que no diferían de las propuestas para vernaditas biogénicas y artificiales.

3.4.11. Ecología de las cepas aisladas con posibilidad de oxidar el manganeso

La mayoría de las cepas aisladas son de especies de hongos relacionadas con las plantas, bien cultivadas o salvajes, a la que, en algunos casos, parasitan y en otros son patógenos oportunistas.

Ello no es extraño dado el ecosistema donde se han aislado, la Faja Pirítica Ibérica, donde predomina la vegetación, bien arbórea, arbustiva o de plantas herbáceas salvajes y abunda el manganeso en el suelo. Otras especies de hongos pudieran estar implantadas en la FPI debido al transporte de sus esporas desde cultivos más o menos cercanos.

Conviene destacar la presencia de algunas especies de hongos acuáticos o que se han aislado de plantas o sedimentos acuáticos, ya que para los oxidantes del manganeso este hábitat es más desconocido y menos estudiado.

3.5. Localización y morfología de los óxidos de manganeso de origen fúngico estudiados al microscopio electrónico de barrido de emisión de campo

Una vez descritas brevemente las cepas que inicialmente se consideraron como posibles oxidantes del manganeso se procedió a su estudio al microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM). En unos casos se observaron al microscopio muestras tomadas directamente de las placas de Petri y, en otros, también de cultivos líquidos. La localización y morfología de los óxidos de manganeso se describe a continuación.

3.5.1. *Ascochyta* sp.

El estudio FESEM de la cepa HM1.1 identificada como *Ascochyta* sp. y aislada de la escombrera de la Mina Pepito reveló la ausencia de óxido de manganeso asociado a las hifas (Figuras 3.36 y 3.37). En las figuras se observan estructuras que no se corresponden con picnidios (más de 100 μm) ni con conidios, ya que estos son cilíndricos. Además la formación de picnidios y conidios en la oscuridad (condiciones de cultivo) es muy rara.

El oscurecimiento del medio AY con manganeso no solo se debe a la oxidación del Mn(II) a Mn(IV), sino que otros mecanismos, no directamente relacionados con la oxidación, pueden tener lugar en los hongos no oxidantes del manganeso. Entre estos mecanismos cabría distinguir la producción de pigmentos, que será discutida en el apartado 4 de esta tesis.

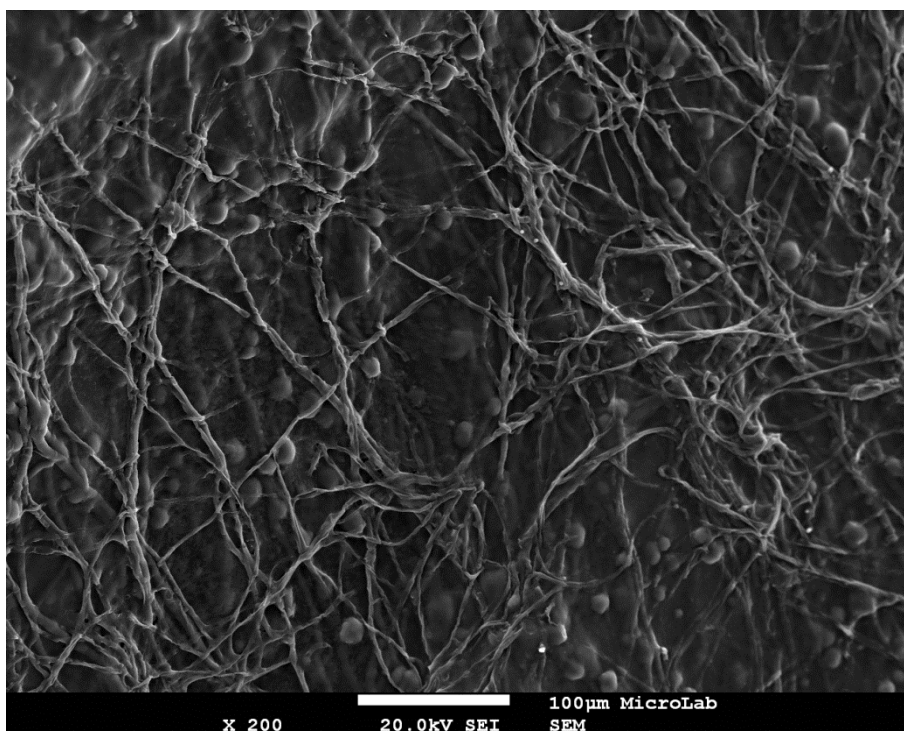


Figura 3.36. Hifas del cultivo de *Ascochyta* sp.

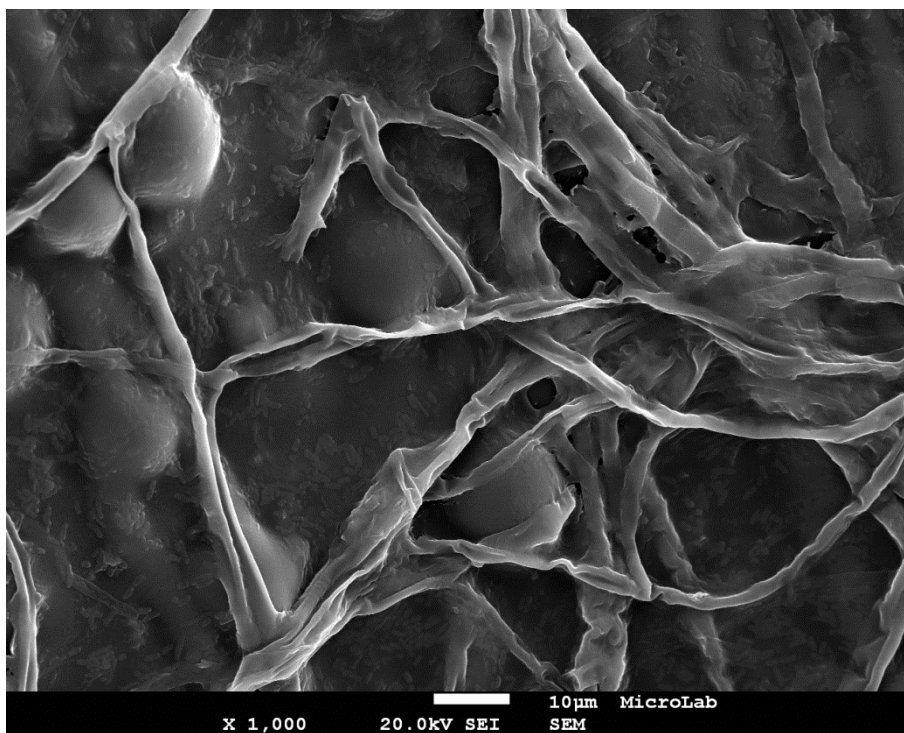


Figura 3.36. Hifas de *Ascochyta* sp. que muestran la ausencia de óxido de manganeso sobre su superficie. Por tamaño, las estructuras globosas no se corresponden con picnidios ($>100\mu\text{m}$) ni con conidios (cilíndricos).

3.5.2. *Bartalinia robillardoides*

El hongo *Bartalinia robillardoides* tiene una ecología fundamentalmente acuática, ya que se aisló del cauce de agua que manaba de la boca de la Mina Pepito. En 1990 Roldán y Honrubia (1990) aislaron esta especie de un río, siendo la primera vez que se encontraba en un medio acuático y describieron esta especie como nueva para España. Desde entonces, no se ha podido encontrar referencias a nuevos aislamientos en nuestro país.

El estudio de *B. robillardoides* se efectuó sobre micelios extraídos de un medio de cultivo líquido. En las Figuras 3.37 a 3.41 se muestra como el entramado de hifas presenta sobre su superficie depósitos de óxido de manganeso, apreciable a mayor aumento, como en las Figuras 3.39 y 3.42. El espectro EDS (Figura 3. 42) confirma que los depósitos son de manganeso.

En las Figuras 3.38 y 3.39 se observan distintos estadios de deposición del manganeso, con unas hifas mineralizadas y otras aún sin el depósito de manganeso. En las Figuras 3.40 y 3.41 se presenta el caso extremo, donde la hifa ha sido totalmente recubierta por un grueso depósito de manganeso y se ha lisado, quedando un tubo de óxido de manganeso, semejante a los que se suelen encontrar en muestras naturales.

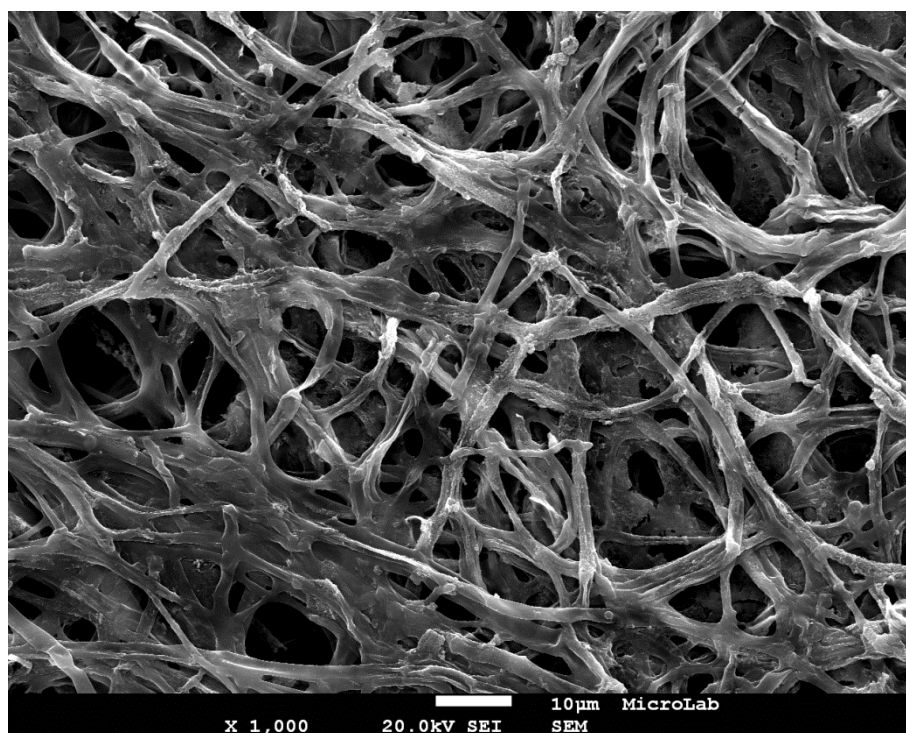


Figura 3.37. Entramado de hifas de *Bartalinia robillardoides* con signos de depósito de manganeso.

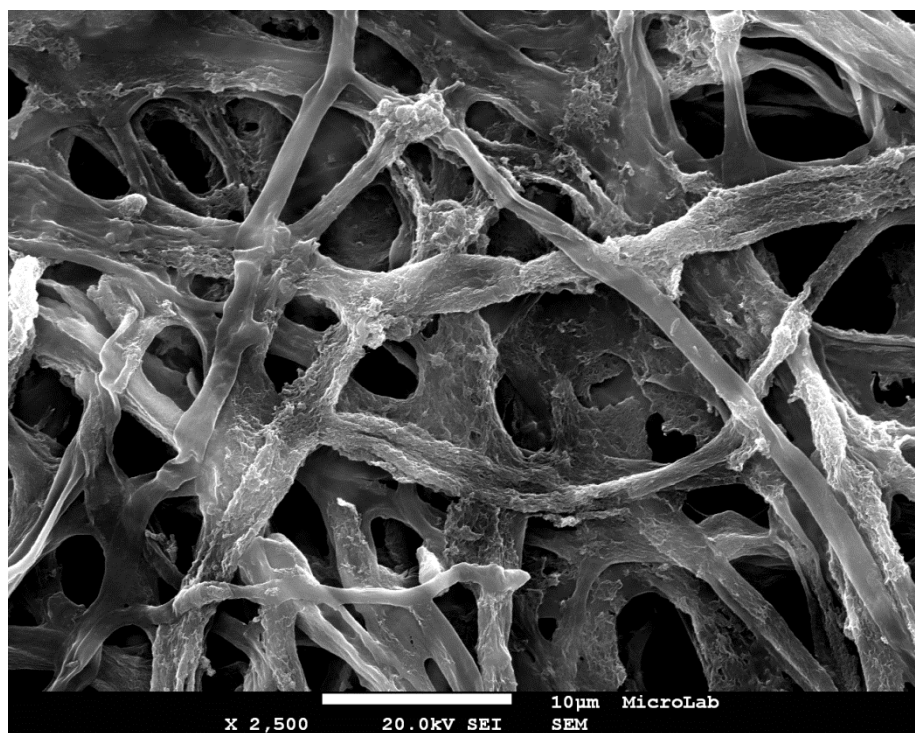


Figura 3.38. Red de hifas de *Bartalinia robillardoides*, unas con depósitos de manganeso y otras sin manganeso.

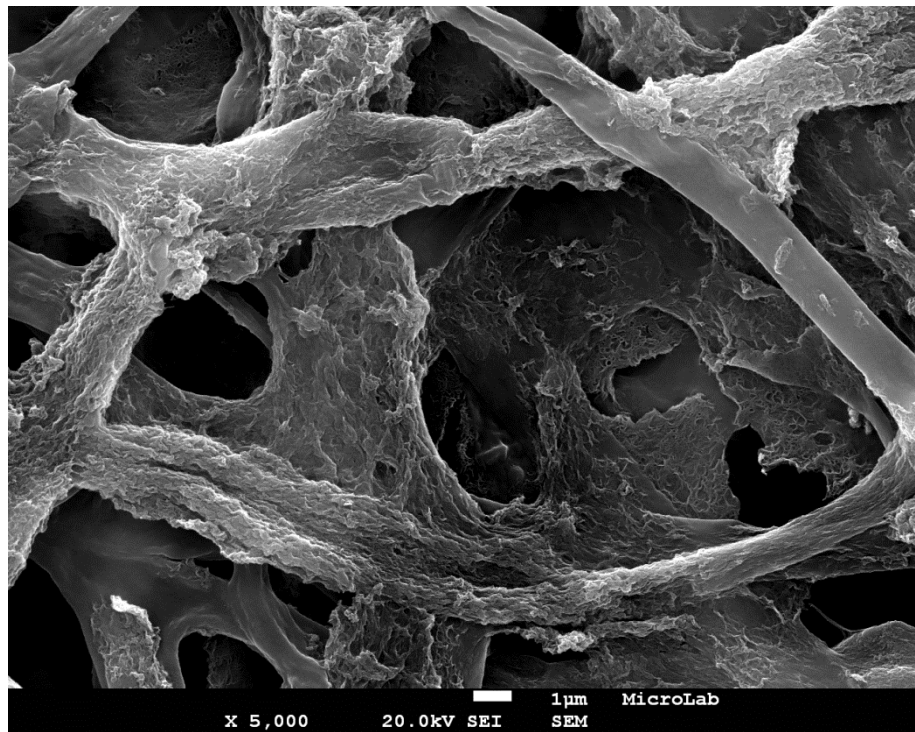


Figura 3.39. Hifas de *Bartalinia robillardoides* recubiertas de manganeso.

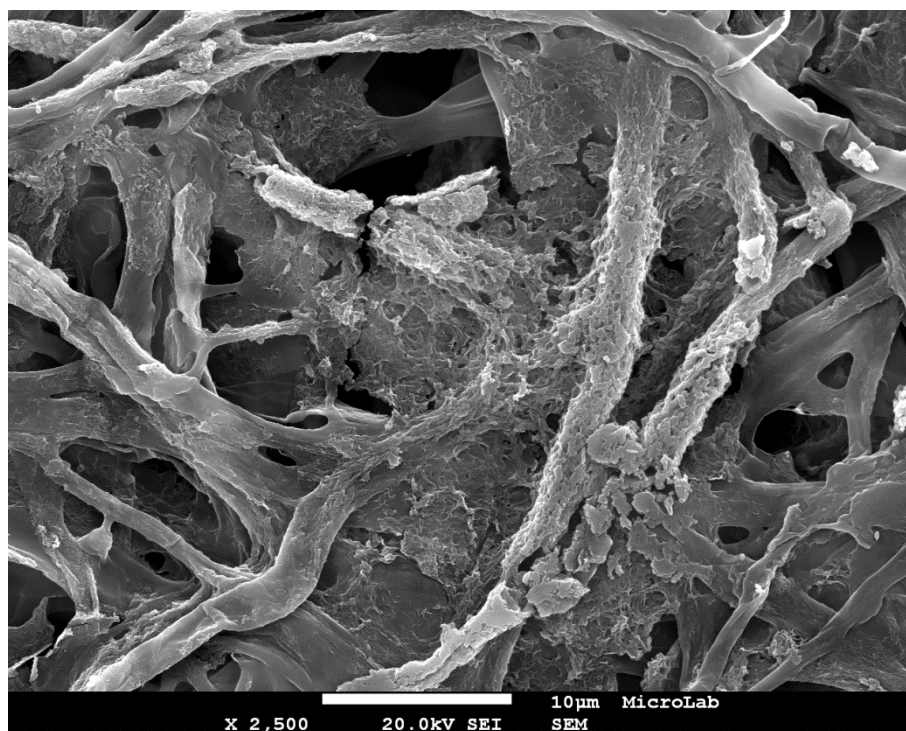


Figura 3.40. Hifas de *Bartalinia robillardoides* con un grueso depósito de manganeso.

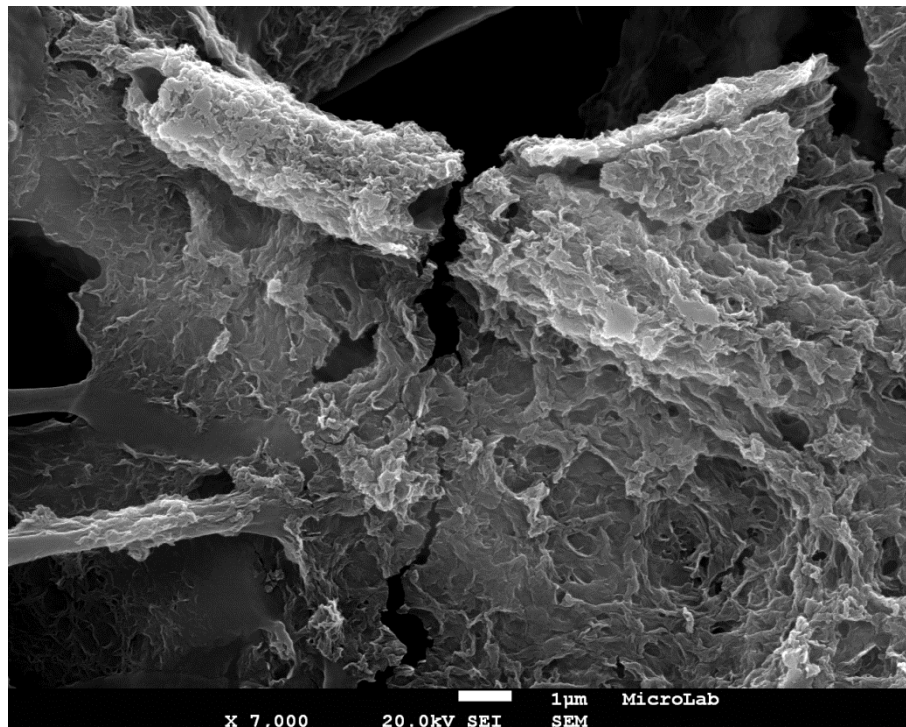


Figura 3.41. Gruesa vaina de óxido de manganeso formada sobre las hifas de *Bartalinia robillardoides* que han servido de molde y placas de mineral anexo.

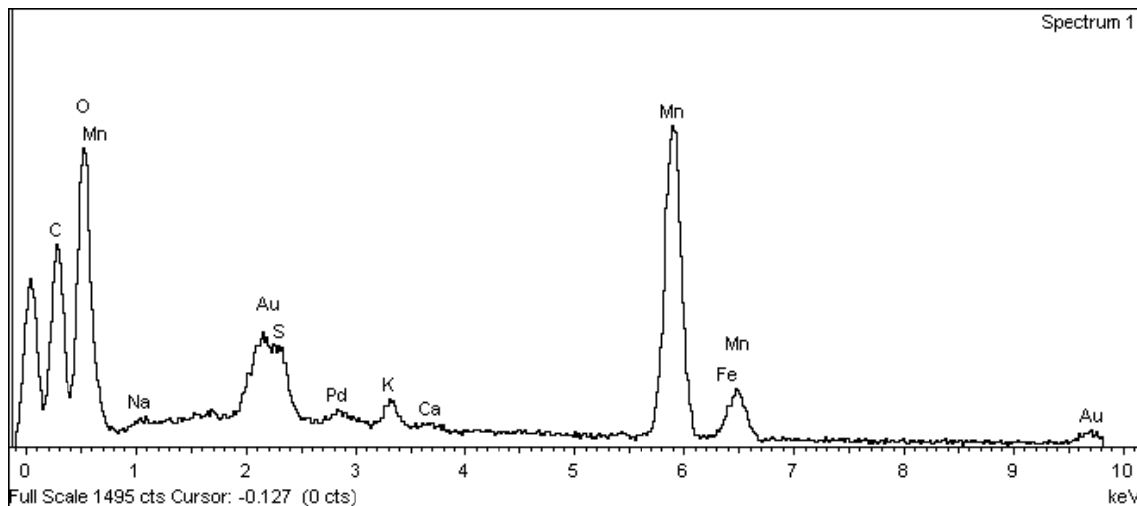


Figura 3.42. EDS del óxido de manganeso sobre las hifas de *Bartalinia robillardoides*.

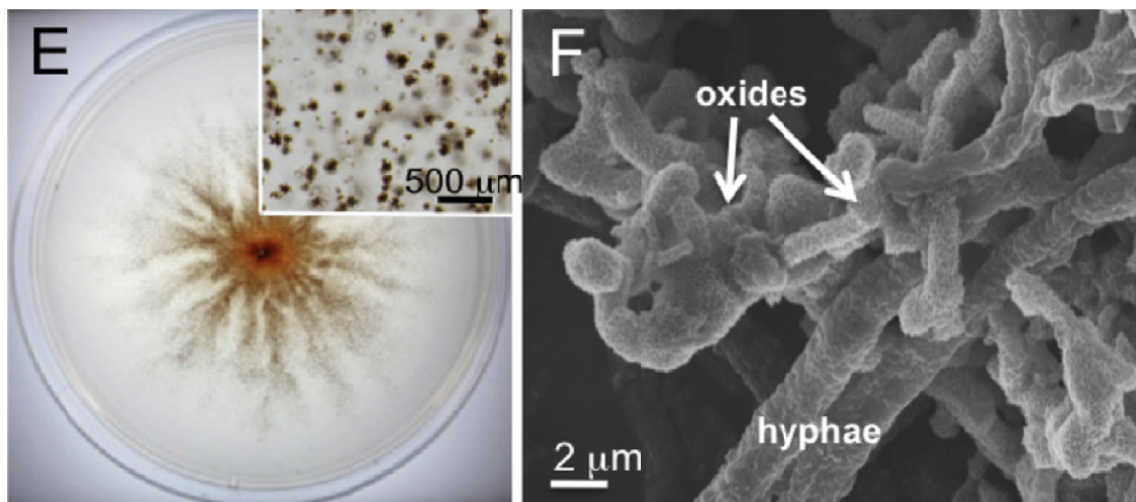


Figura 3.43. Imágenes al microscopio óptico (izquierda) y al SEM (derecha), del hongo *Stagonospora* sp. (E y F), cultivado en medio suplementado con 200 mM Mn^{2+} . La imagen de la derecha corresponde a un cultivo en medio líquido (adaptado de Santelli et al., 2010).

La vaina mineralizada de *Bartalinia robillardoides* de las Figuras 3. 39 y 3.40 recuerdan las observadas previamente por Santelli et al. (2011), que se presenta en la Figura 3.43, y que los autores atribuyen a birnesita triclinica.

3.5.3. *Acrostalagmus luteoalbus*

Del hongo *Acrostalagmus luteoalbus* se estudiaron las dos cepas aisladas, tanto en medio sólido (placa de Petri), como en medio líquido.

Las cepas MH0413_H3.3 y MH0413_H3.4 presentaron la misma morfología en medio sólido, donde destacaba la superficie de las hifas recubiertas de óxido de manganeso, así como agregados de óxido en su cercanía (Figura 3.44). Es destacable la gran cantidad de esferas de óxido de manganeso en todo el campo. Estos se observan claramente a mayor aumento (Figuras 3.45 y 3.46).

En este hongo, el óxido de manganeso adquiere una morfología típica, que se nuclean alrededor de las hifas, agrupados en racimos esféricos, semejantes a los publicados por Santelli et al. (2010) para *Plectosphaerella cucumerina* y *Pyrenochaeta* sp. (Figura 3.47).

En otros campos de visión *Acrostalagmus luteoalbus* exhibe sus conidióforos y conidios (Figuras 3.48 a 3.51), que no están mineralizados por los óxidos de manganeso. En las Figuras 3.50. y 3.51 se observan claramente que los conidióforos emergen de las hifas, ya mineralizadas.

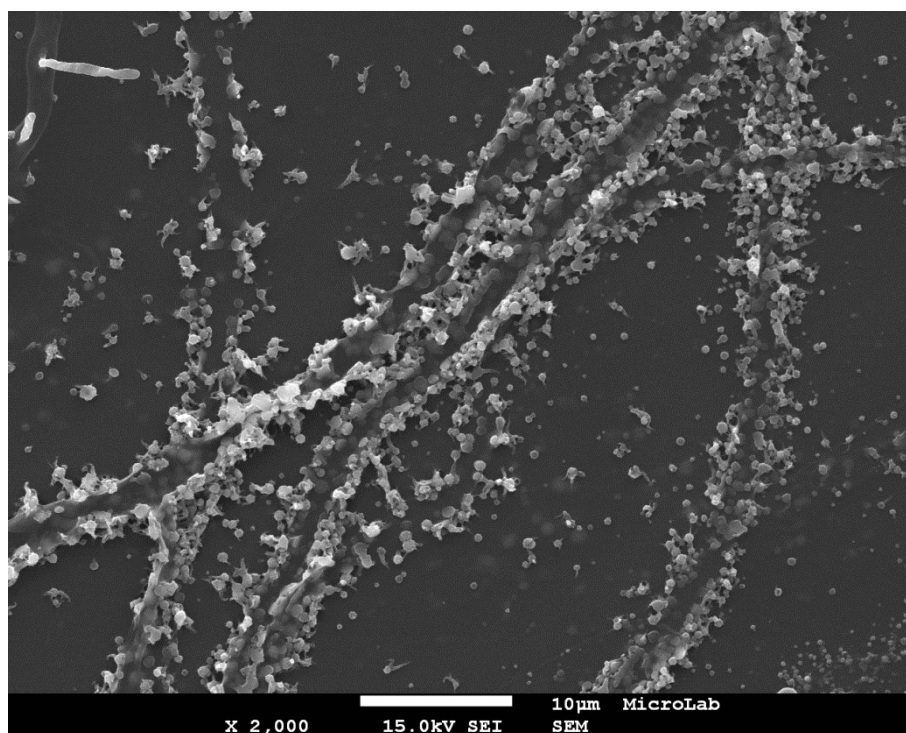


Figura 3.44. Hifas de *Acrostalagmus luteoalbus* en cuya superficie se encuentran asociados agregados esféricos de óxido de manganeso.

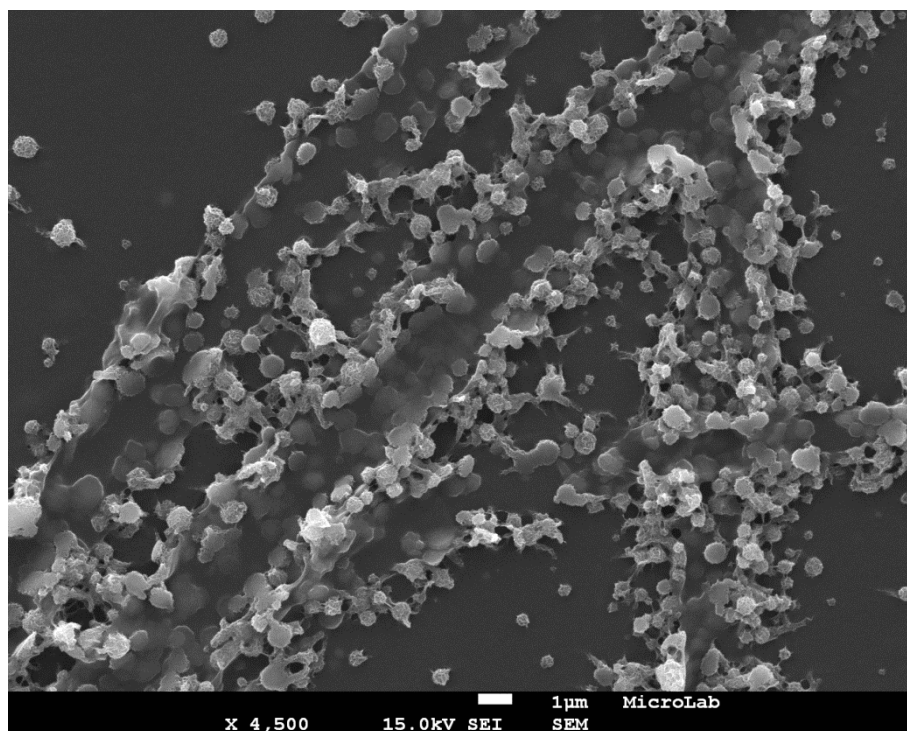


Figura 3.45. Abundancia de agregados de óxido de manganeso con forma esférica alrededor de las hifas de *Acrostalagmus luteoalbus*.

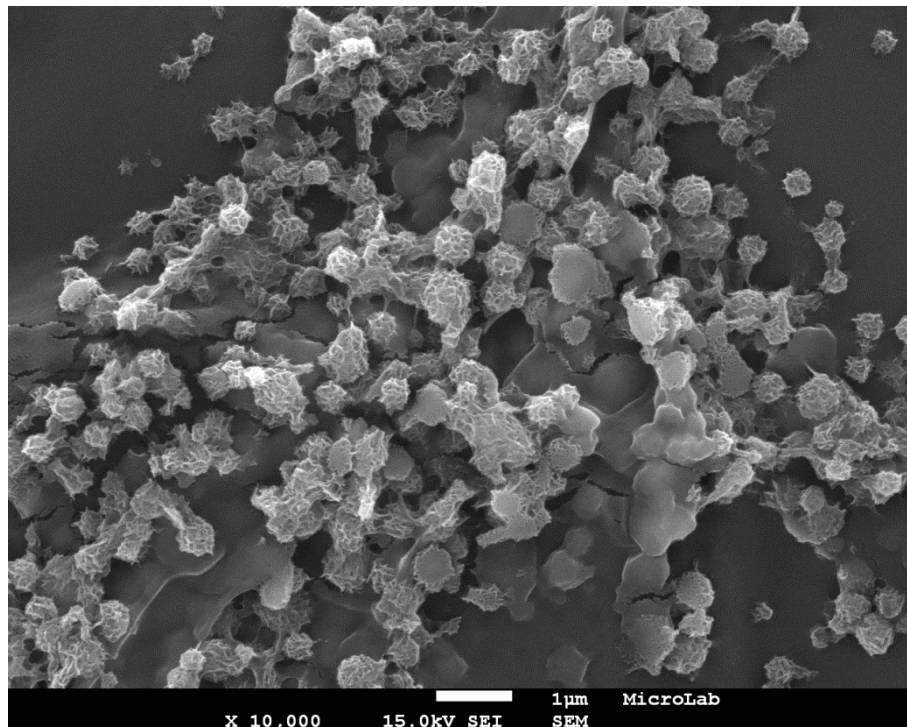


Figura 3.46. Óxido de manganeso biogénico asociado a las hifas de *Acrostalagmus luteoalbus*.

En el hongo *Acrostalagmus luteoalbus* junto a las hifas se diferenciaron claramente los conidióforos y conidios, tal como aparecen en la publicación de Grum-Grzhimaylo et al. (2016), que se muestra en la Figura 3.52.

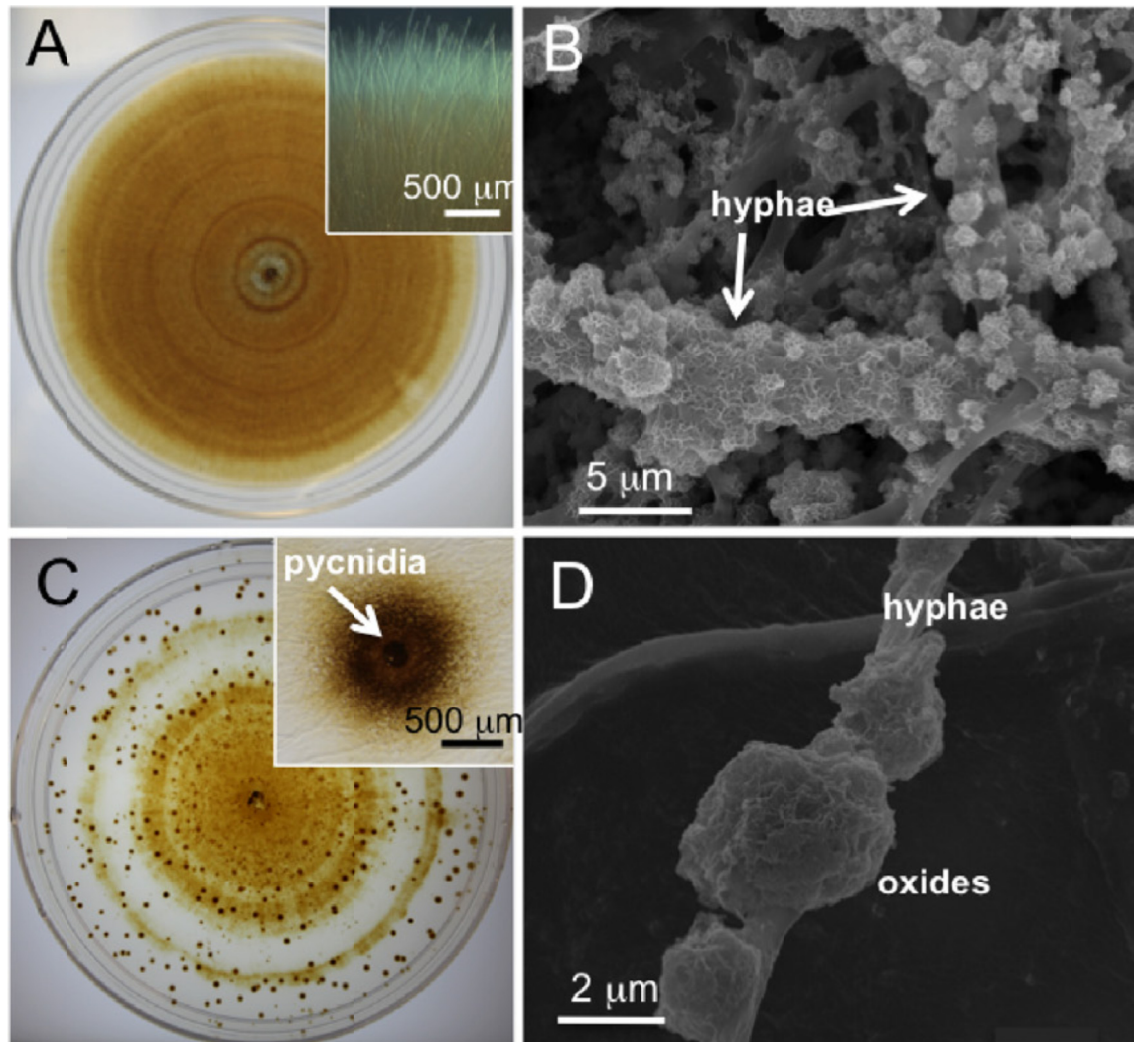


Figura 3.47. Imágenes al microscopio óptico (izquierda) y al SEM (derecha), de los hongos *Plectosphaerella cucumerina* (A y B) y *Pyrenochaeta* sp. (C y D), crecidos en medio suplementado con 200 mM Mn^{2+} . Las imágenes de la derecha corresponden a cultivo en medio líquido. Las imágenes muestran la relación entre las hifas y los óxidos de manganeso precipitados por los hongos (adaptado de Santelli et al., 2010).

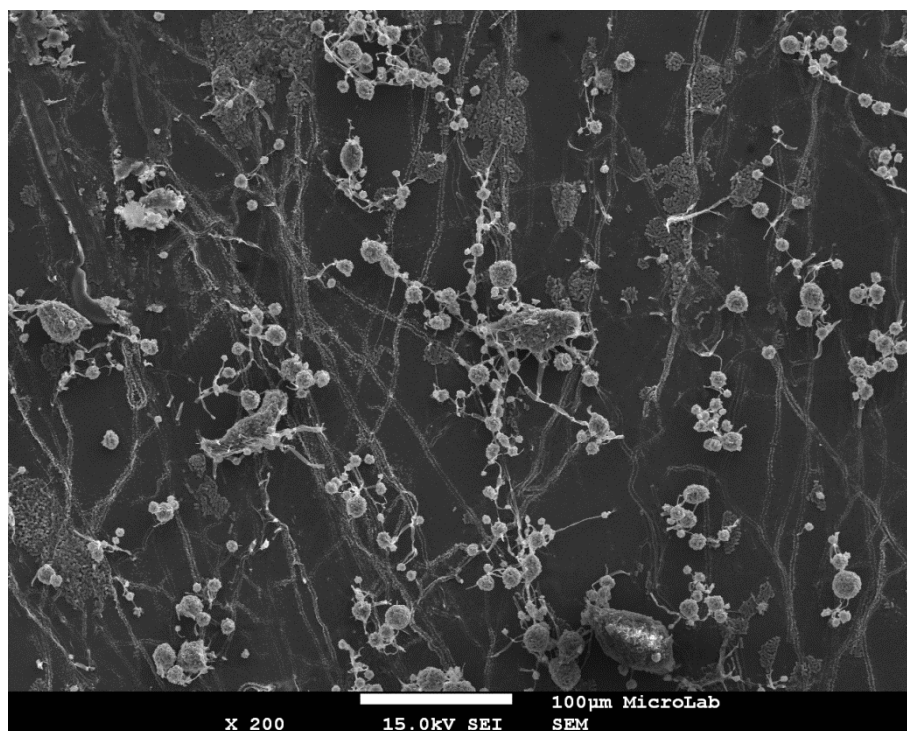


Figura 3.48. Hifas mineralizadas, conidióforos y conidios de *Acrostalagmus luteoalbus*.

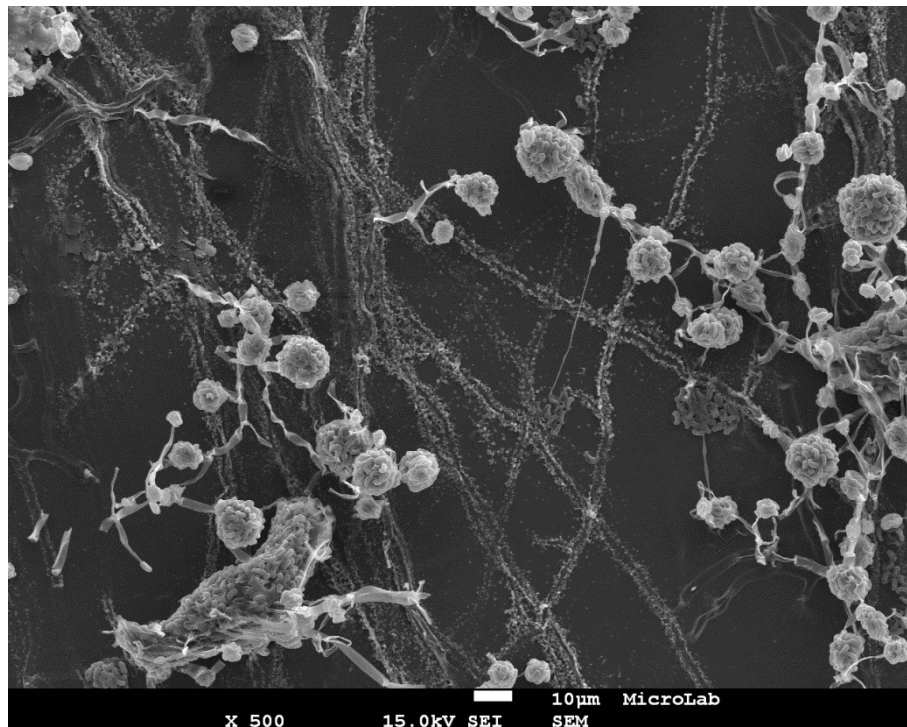


Figura 3.49. Hifas mineralizadas, conidióforos y conidios de *Acrostalagmus luteoalbus* a mayor aumento, donde se observan claramente los conidióforos y sus conidios.

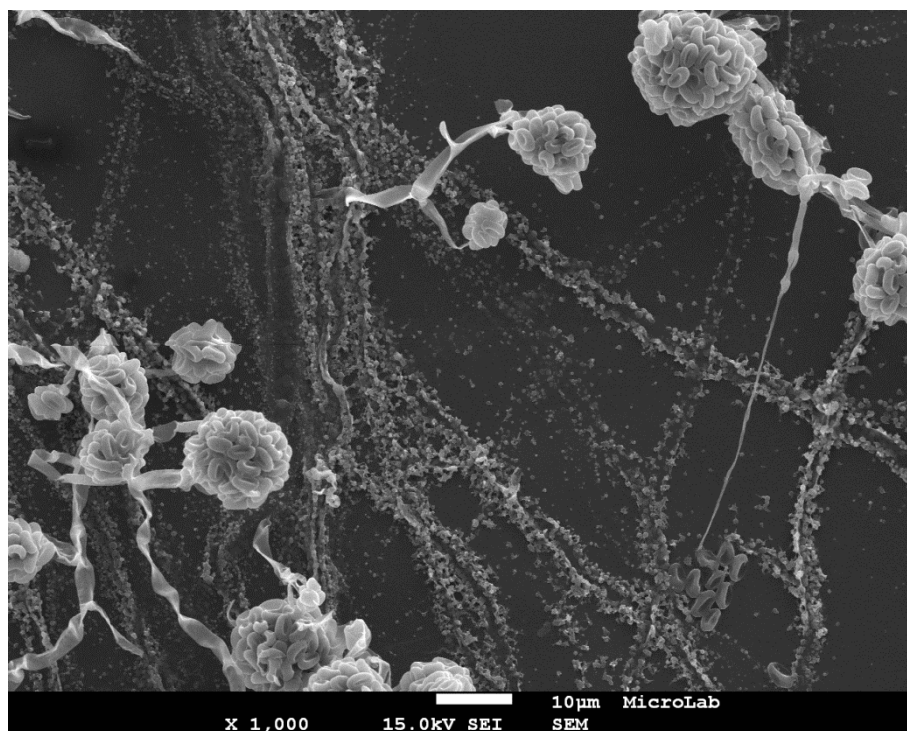


Figura 3.50. Conidióforos de *Acrostalagmus luteoalbus* semejantes a los de la Figura 3.52.

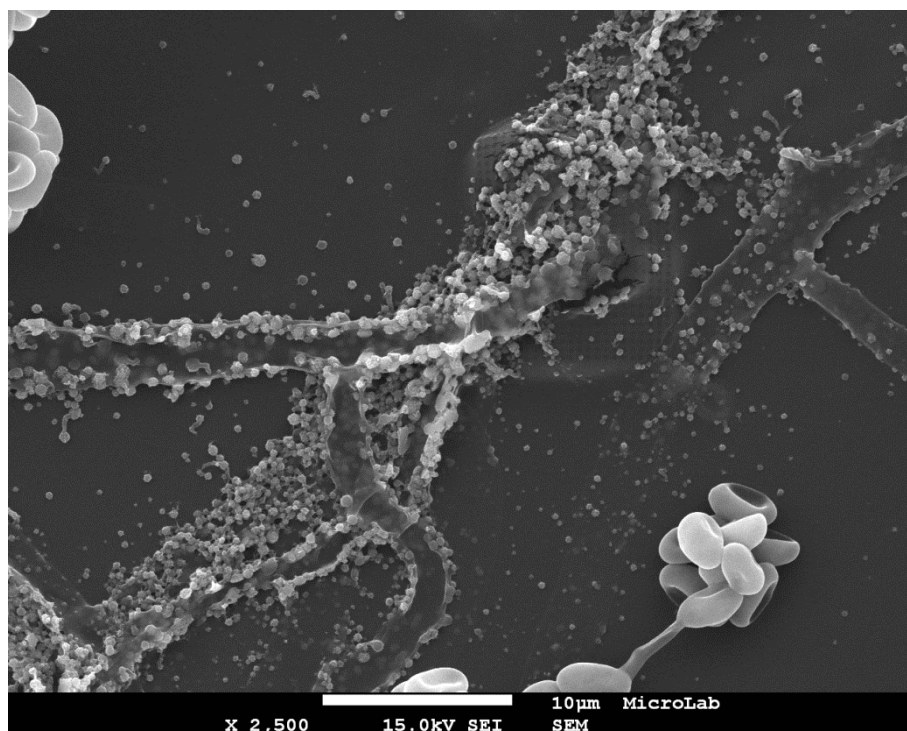


Figura 3.51. En primer término conidióforo de *Acrostalagmus luteoalbus* y en el centro hifas con abundantes agregados esféricos de óxido de manganeso.

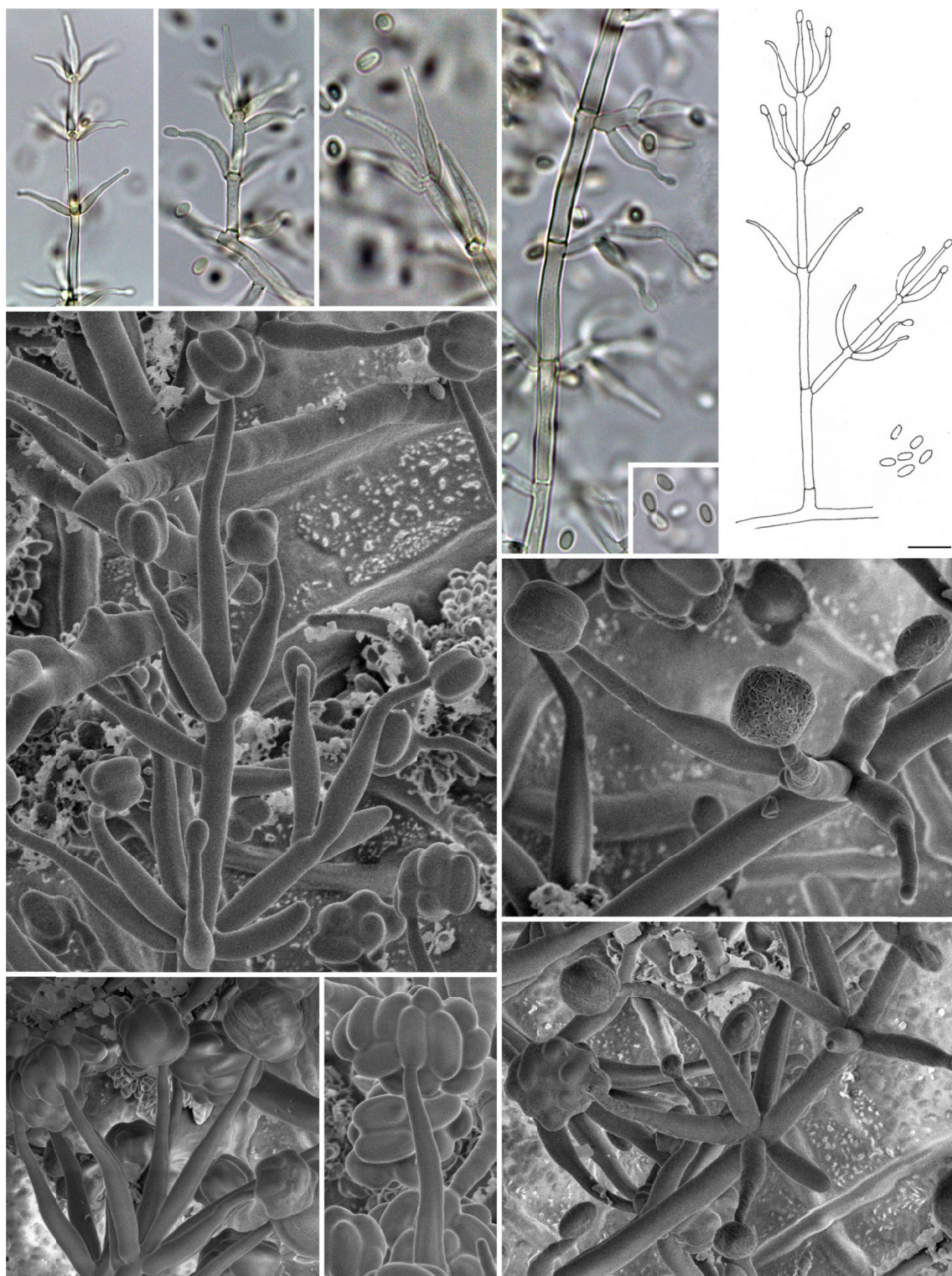


Figura 3.52. *Acrostalagmus luteoalbus* V205 (=CBS137625). Conidióforos y conidios (Grum-Grzhimaylo et al., 2016).

En medio líquido el aspecto de ambas cepas cambió, mostrando agregados de hifas y óxidos de manganeso en forma de esferas, consistente con la morfología observada en los matraces.

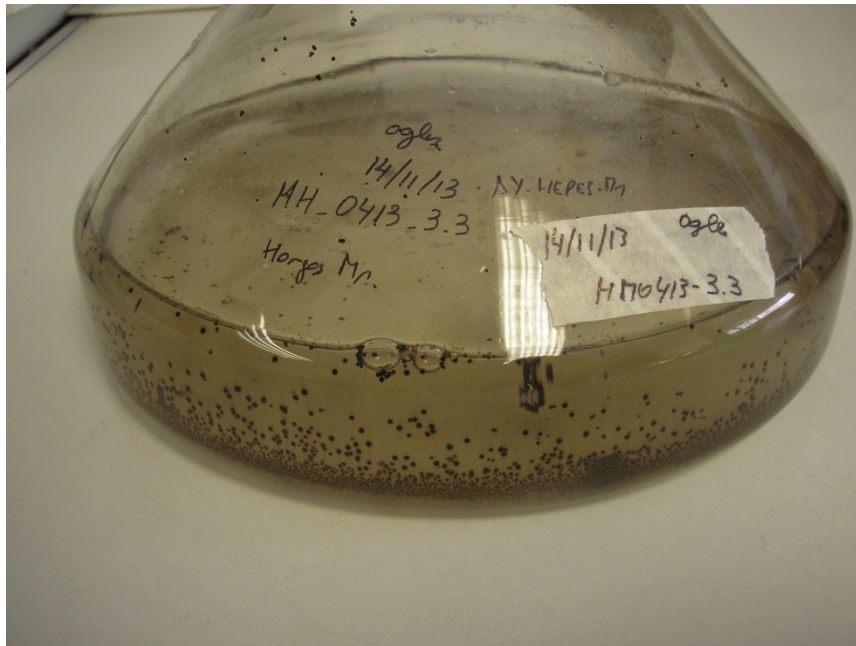


Figura 3.53. Matraz con medio de cultivo AY-HEPES-Mn donde se aprecia el crecimiento de *Acrostalagmus luteoalbus* de forma esférica formada por masas de hifas.

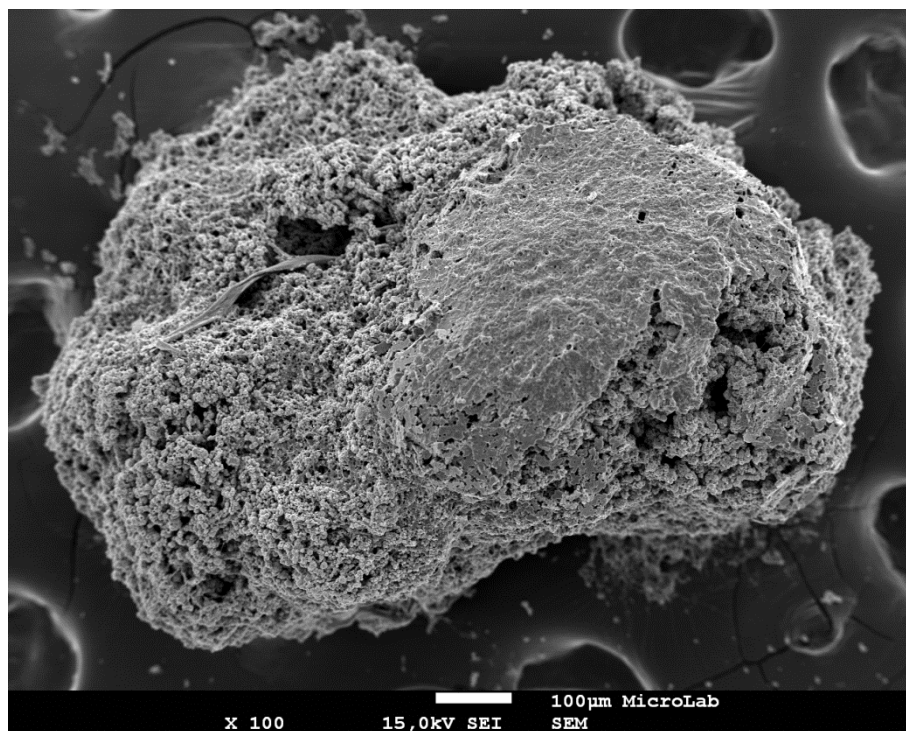


Figura 3.54. Esfera extraída del cultivo de *Acrostalagmus luteoalbus*, formada por un entramado de hifas y óxido de manganeso.

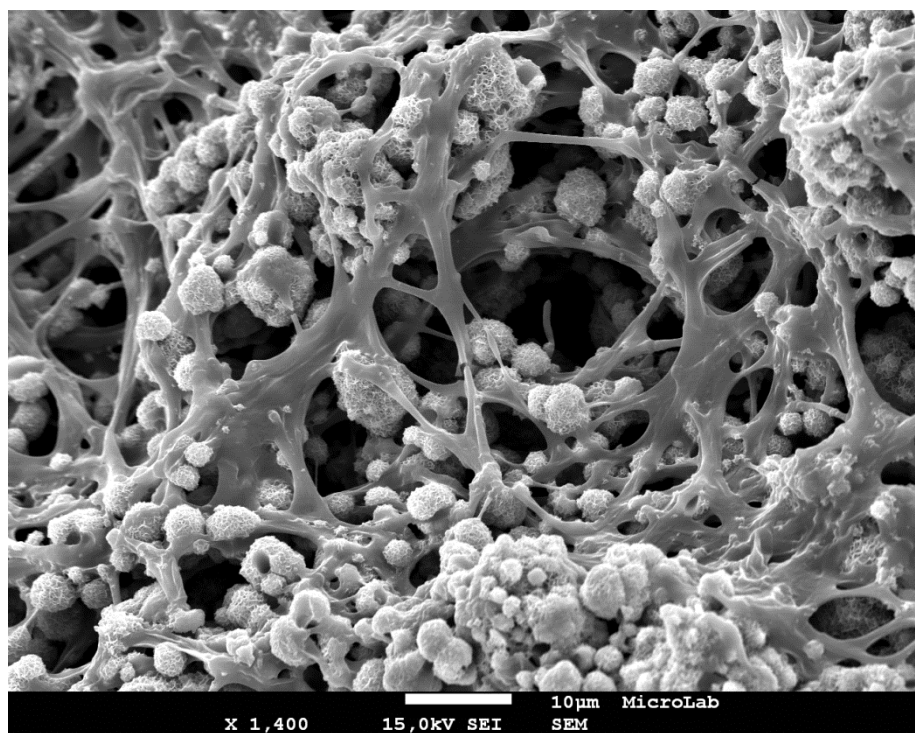


Figura 3.55. Detalle de la Figura 3.54 mostrando la red de hifas y el óxido de manganeso asociado.

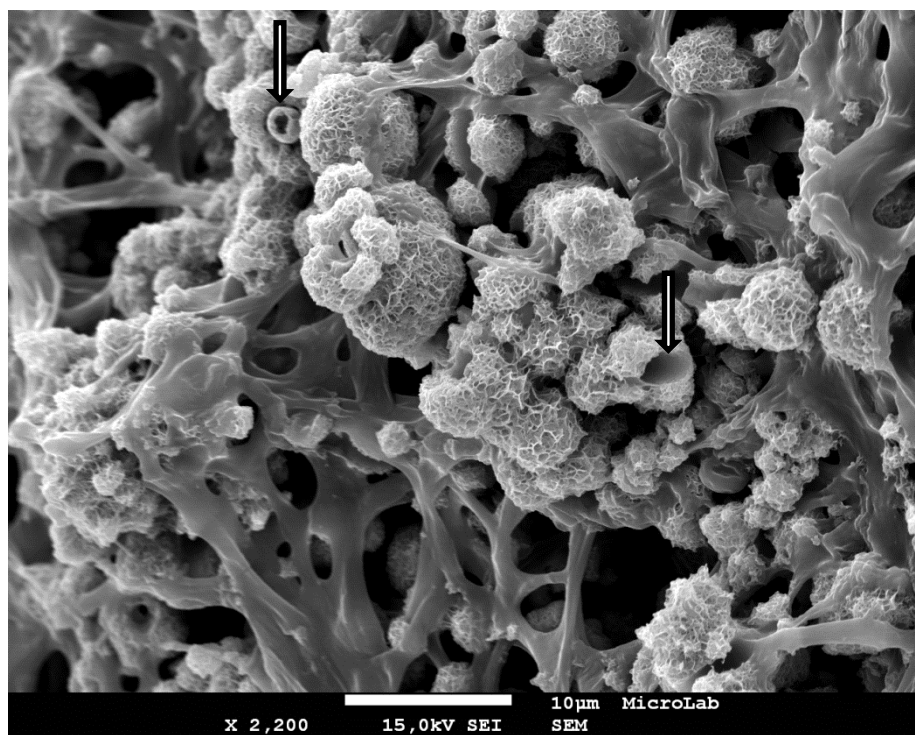


Figura 3.56. Esferas de óxido de manganeso, algunas de ellas agrupadas formando una vaina que recubre las hifas (flechas).

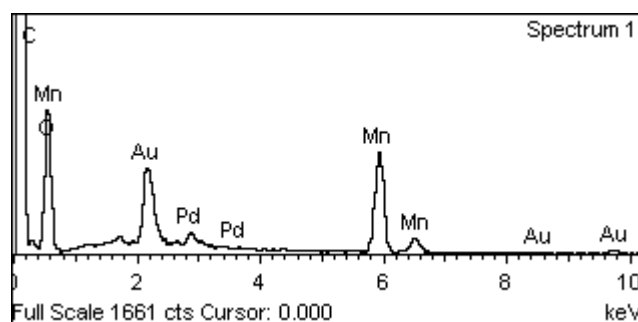
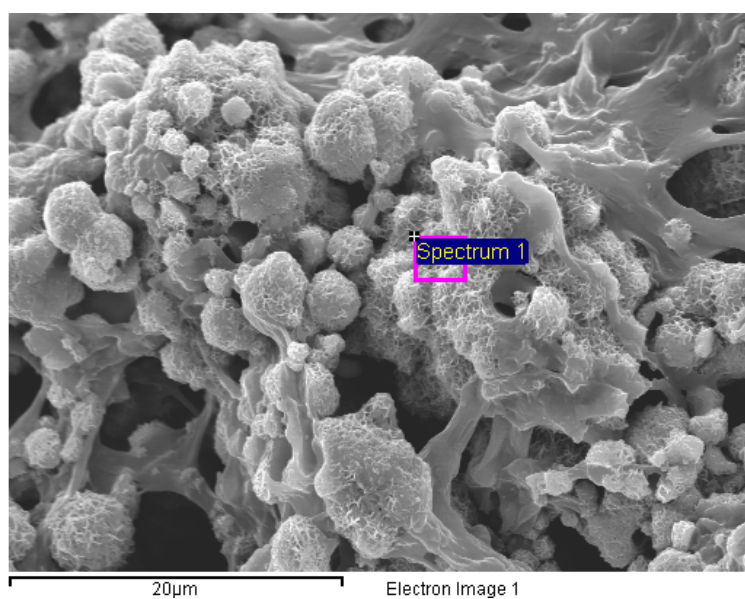
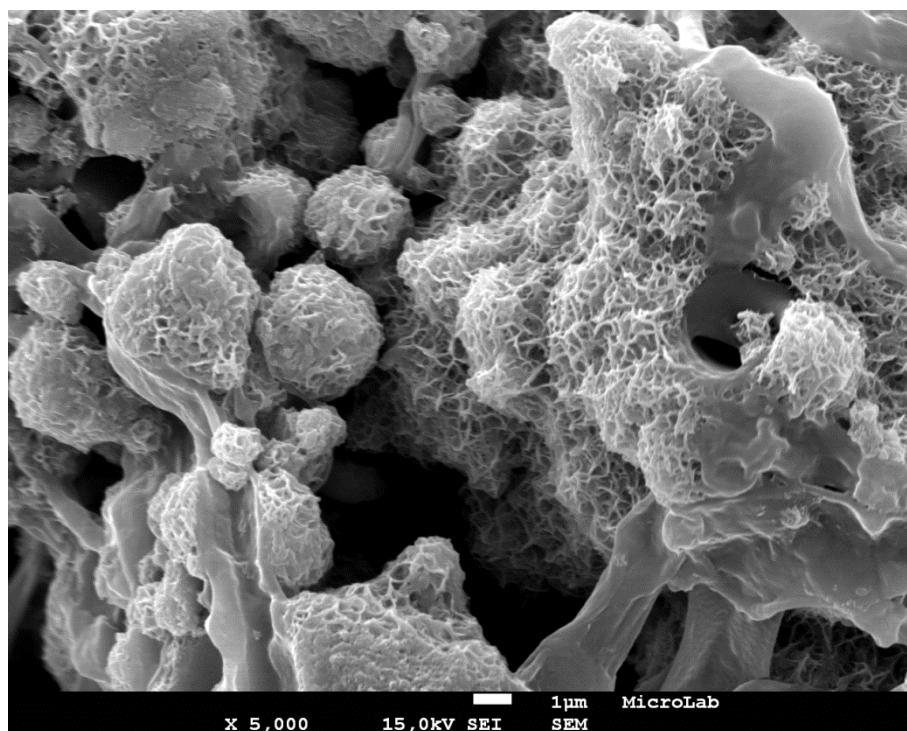


Figura 3.57. EDS de la masa de óxido de manganeso en la imagen FESEM, con abundancia de carbono (hongo), manganeso y oxígeno.

3.5.5. *Myrothecium gramineum*

El estudio FESEM de las dos cepas de *Myrothecium gramineum* (MH0413_H4.1 y MH0413_H5.2), aisladas de la Mina Pepito no reveló la presencia de óxidos de manganeso (Figuras 3.58 y 3.59).

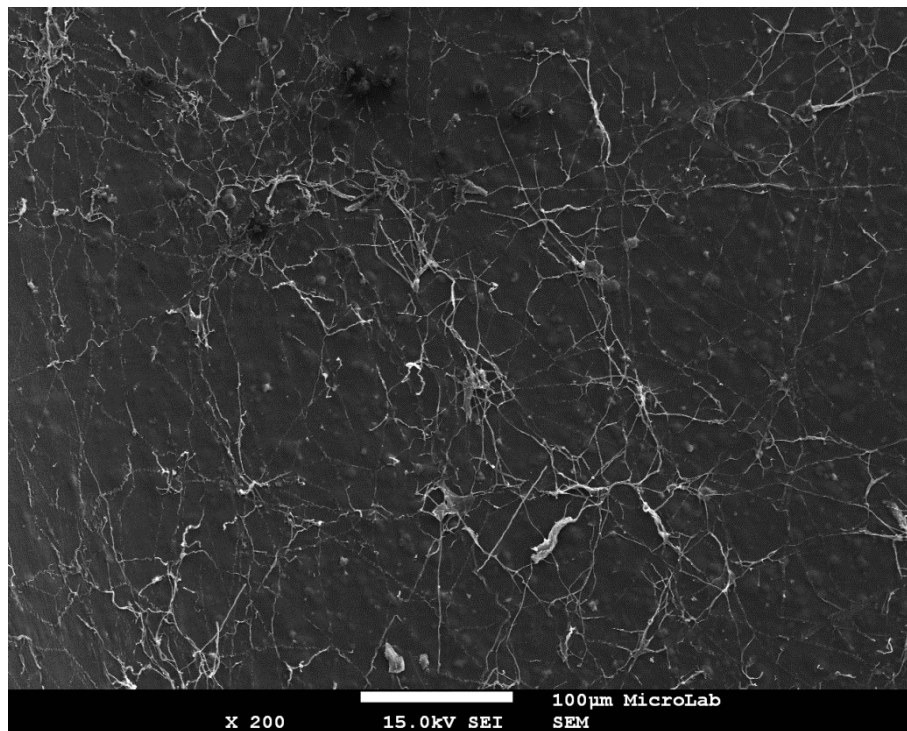


Figura 3.58. Hifas de *Myrothecium gramineum* sin mineralizar.

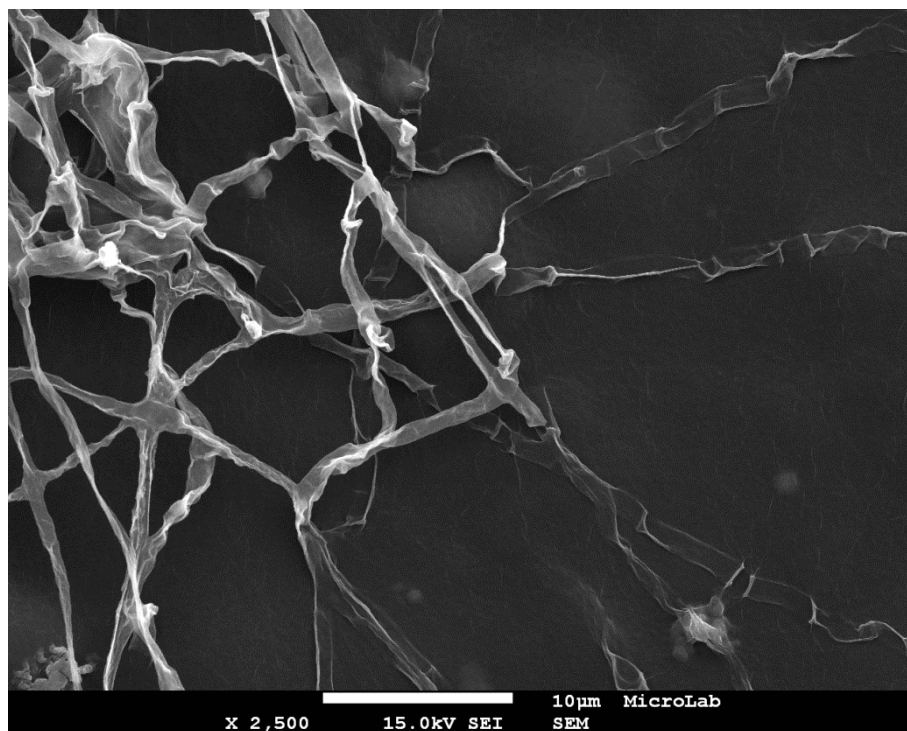


Figura 3.59. Hifas a mayor aumento.

3.5.6. *Pseudopithomyces chartarum*

Dos de las tres cepas de *Pseudopithomyces chartarum* (MH0413_H4.2, y H5.1) aisladas de la escombrera y del cauce cercano a esta no mostraron signos de oxidación del manganeso en las hifas (Figuras 3.60 y 3.61).

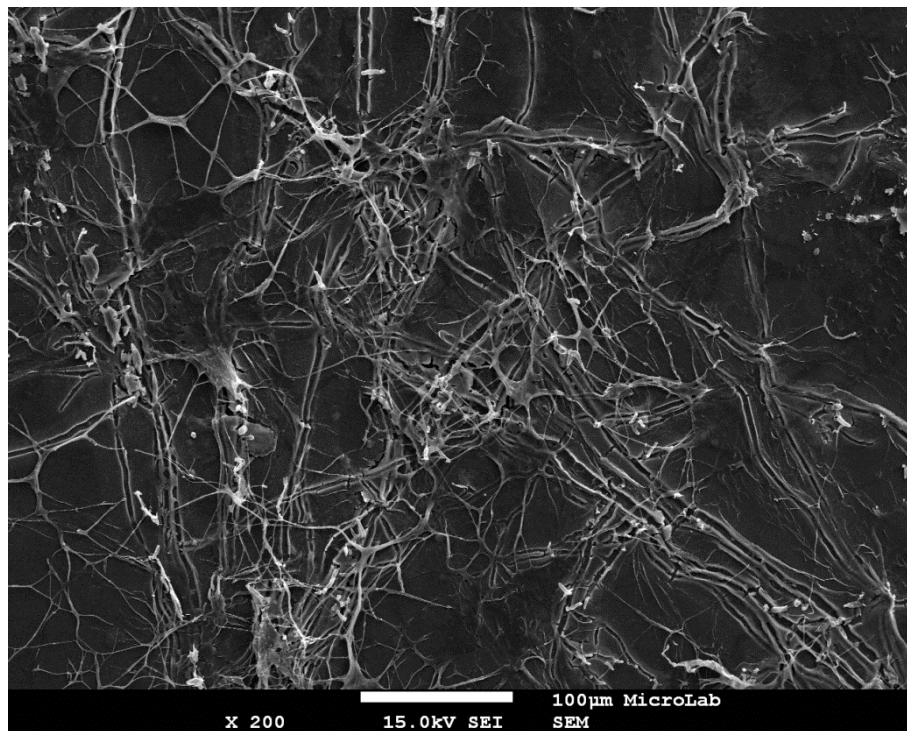


Figura 3.60. Entramado de hifas de *Pseudopithomyces chartarum*.

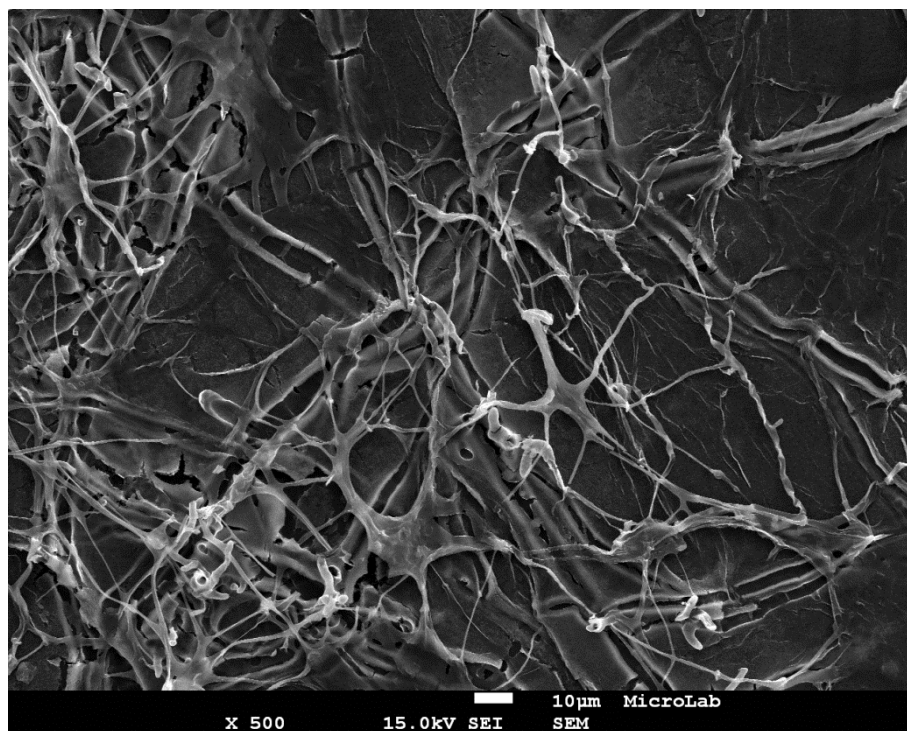


Figura 3.61. Hifas de *Pseudopithomyces chartarum* sin óxido de manganeso.

Otra cepa de *Pseudopithomyces chartarum* (MH0413_H4.3) resultó dudosa, ya que en contadas observaciones se pudo registrar mineralización alrededor de las hifas (Figura 3.62).



3.5.7. *Alternaria alternata*/A. *tenuissima*

Las cepas de *Alternaria alternata*/A. *tenuissima* (MH0413_7.1 y 13.2) aisladas de la Peña del Hierro y de la Mina Poderosa no mostraron oxidación del manganeso. Dada la imposibilidad de discriminar exactamente la especie de *Alternaria* a la que corresponde nuestra cepa, al presentar varias especies una similitud del 100% con ella, no podemos conocer exactamente si nuestra cepa, en caso de ser *Alternaria alternata*, habría perdido la capacidad de oxidar manganeso. Y ello porque en la literatura existe una referencia a *Alternaria alternata* como hongo oxidante del manganeso (Santelli et al., 2010), aunque los autores no proporcionan más datos ni discuten el metabolismo de esta especie.

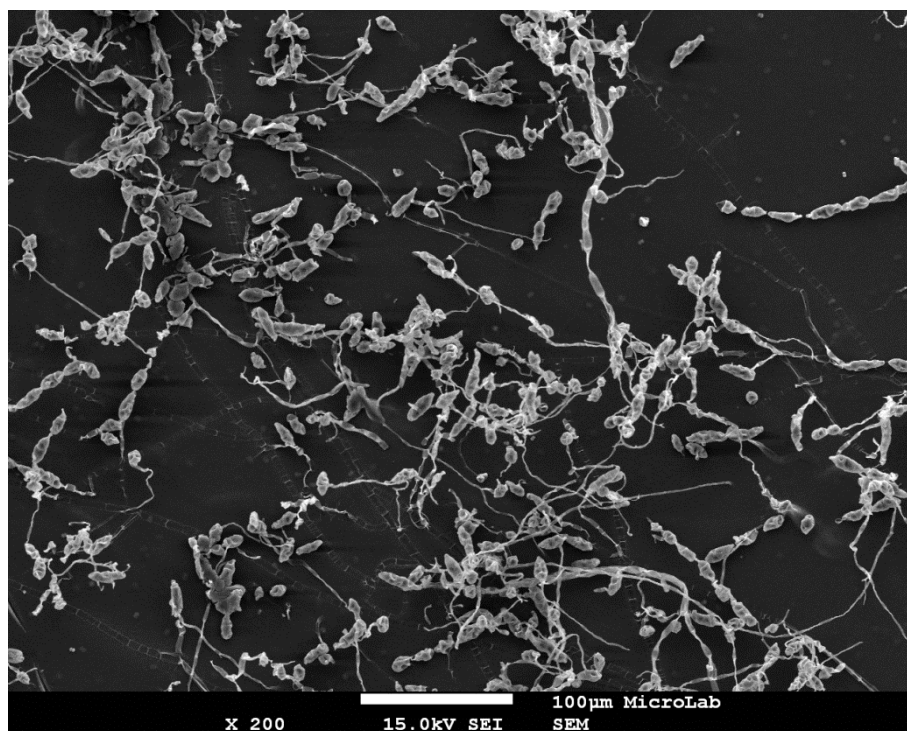


Figura 3.62. Hifas y conidios de *Alternaria alternata*/A. *tenuissima*.

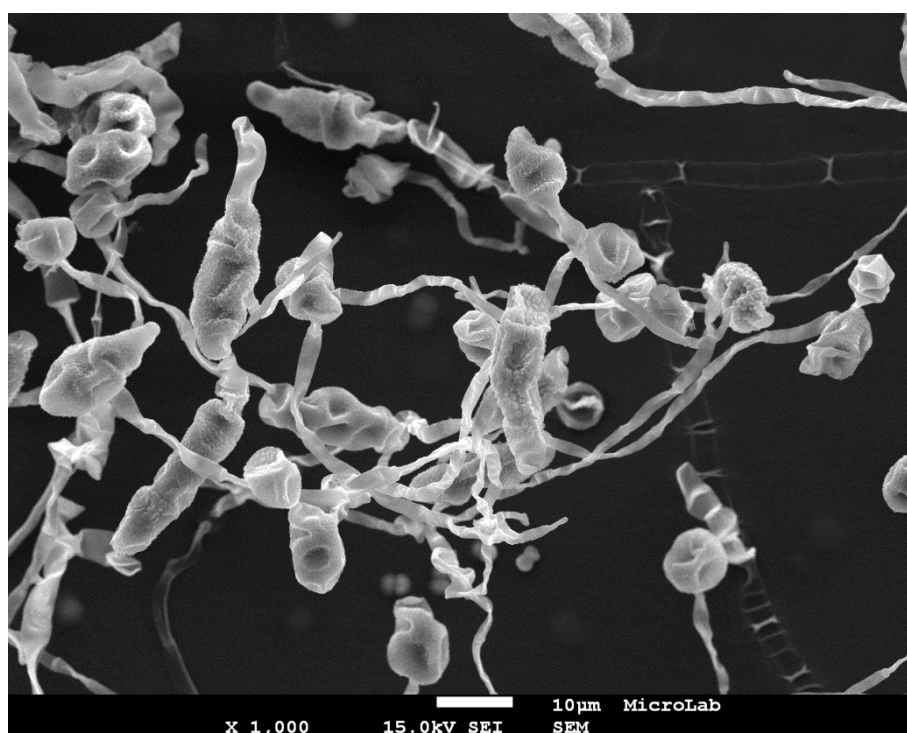


Figura 3.62. Conidios e hifas (en segundo plano) de *Alternaria alternata*/A. *tenuissima*.

3.5.8. *Drechslera avenae*

La superficie de las hifas de la cepa de *Drechslera avenae* (MH0413_H7.2) aislada de la Peña del Hierro mostró una intensa mineralización que la recubría totalmente.

Esta mineralización se presentó de dos maneras, por una parte las típicas esferas de óxido de manganeso, asociadas a las hifas (Figuras 3.63 y 3.64) y, por otra, las propias hifas estaban totalmente recubiertas de una capa mineral, lisa o con protuberancias que sugerían una cristalización secundaria sobre ella (Figuras 3.65 y 3.66).

Santelli et al. (2010) observaron en los hongos *Stagonospora* sp. y *Acremonium strictum* una precipitación del manganeso distinta a las típicas esferas, ya descritas anteriormente. En efecto, estos autores señalaron que el tipo de precipitación de los óxidos de manganeso depende de la especie de hongo. En estos dos hongos, el óxido de manganeso parece formar un conglomerado de cristales densamente empaquetados, como los de las Figuras 3.65 y 3.66.

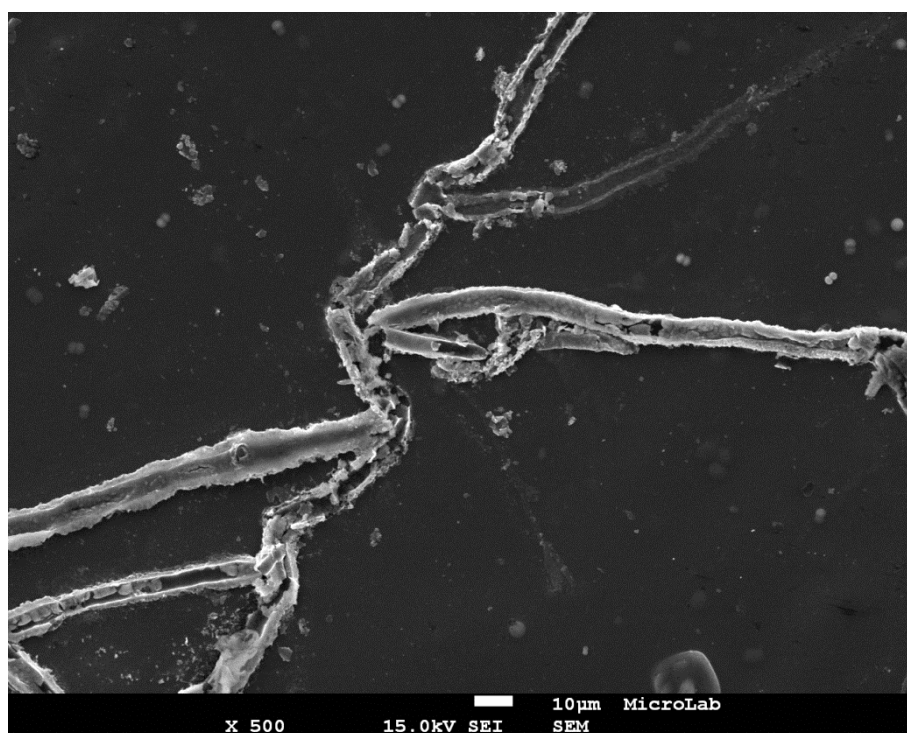


Figura 3.63. Hifas de *Drechslera avenae* con una densa precipitación de óxido de manganeso sobre ella y a su alrededor.

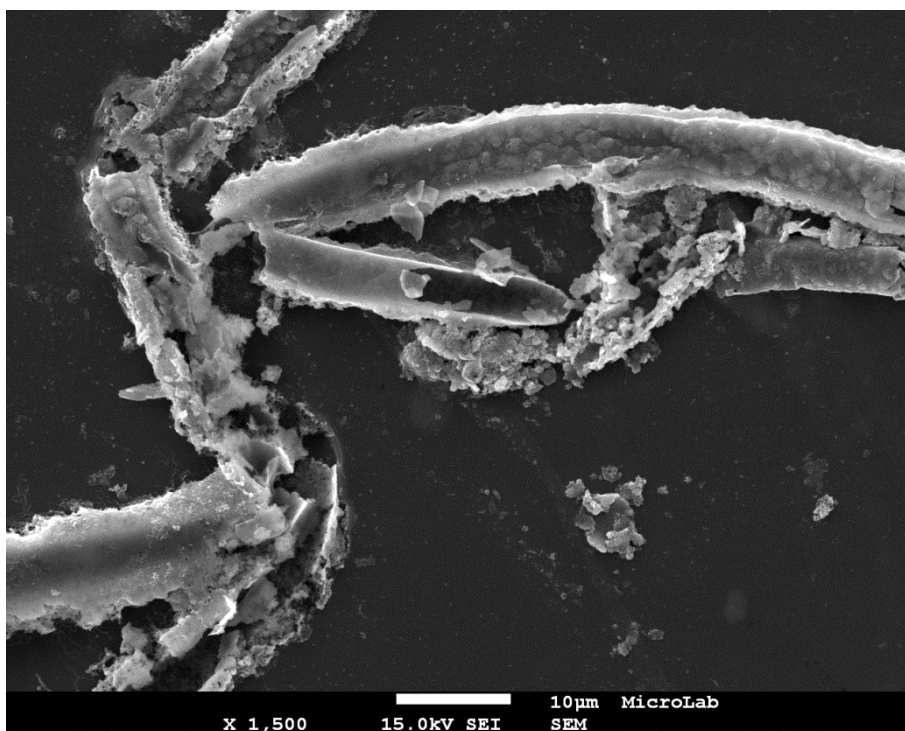


Figura 3.64. Dos tipos de precipitados de óxido de manganeso en las hifas de *Drechslera avenae*.

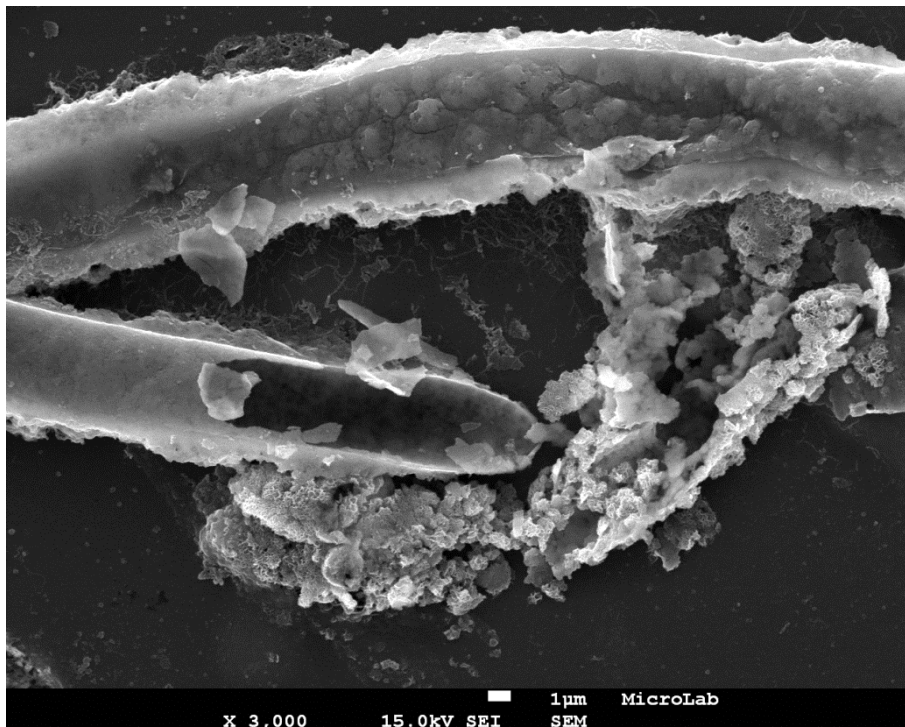


Figura 3.65. Detalle de los dos tipos de precipitados de óxido de manganeso sobre las hifas de *Drechslera avenae*.

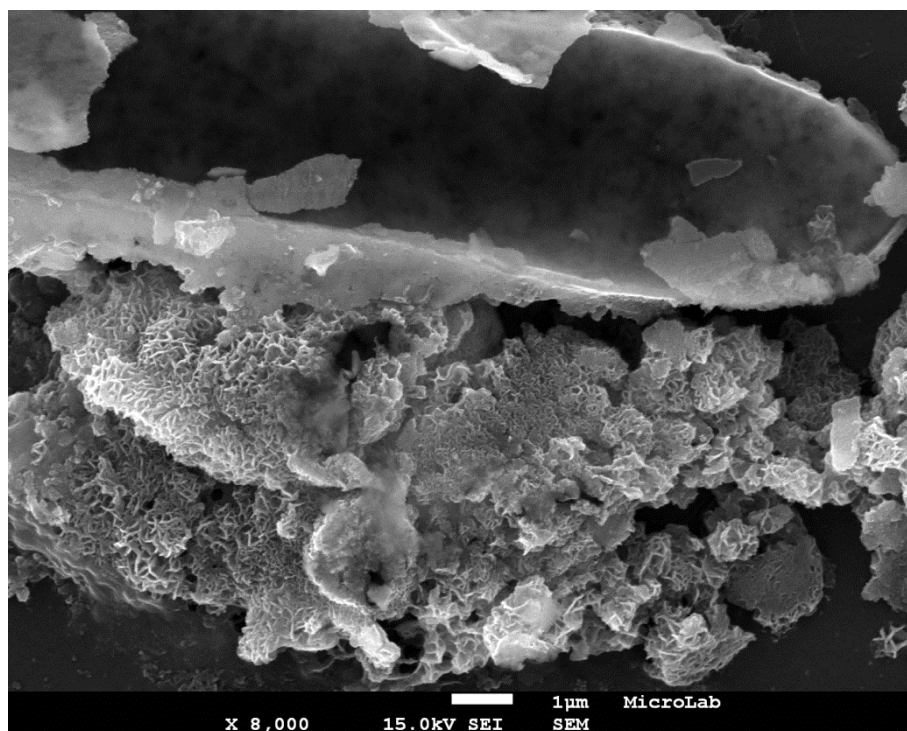


Figura 3.66. Vaina uniforme de manganeso sobre la hifa de *Drechslera avenae* y típicas esferas de óxido de manganeso anexas.

3.5.9. *Paraphaeosphaeria* sp.

La cepa MH0413_H13.5 de *Paraphaeosphaeria* sp. se aisló de cristales de melanterita en el cauce de un reguero que manaba de la Mina Poderosa y presentó agregados de óxido de manganeso, no en forma de esferas, sino de masas empaquetadas más o menos densamente y con algunas superficies lisas (Figuras 3.67 y 3.68).

Santelli et al. (2010) ha descrito este tipo de precipitaciones de óxido de manganeso en cultivos del hongo *Acremonium strictum* que crecían sobre medio sólido y lo atribuyen a la formación de birnesita y todorokita, conjuntamente (Figura 3.69). Estos autores consideraron que la precipitación en forma de esferas se debía a la formación de birnesita hexagonal nanoparticulada, pobremente cristalina, que se asemejaba al δ -MnO₂ sintético. La filogenia y las condiciones de cultivo llevan a la conversión del filomanganato inicial a fases más ordenadas, tales como la todorokita (tectomanganato). La precipitación de todorokita como producto de oxidación microbiana, sin embargo, es mucho menos frecuente en hongos que la de birnesita, según Santelli et al. (2010), aunque algunos estudios han demostrado la formación de birnesita y todorokita por hongos (Miyata et al., 2006, Saratovsky et al., 2009; Granjeon et al., 2010). Las transformaciones abióticas

y el envejecimiento de las fases biogénicas inicialmente desordenadas resultarían en la formación de fases de manganeso más ordenadas.

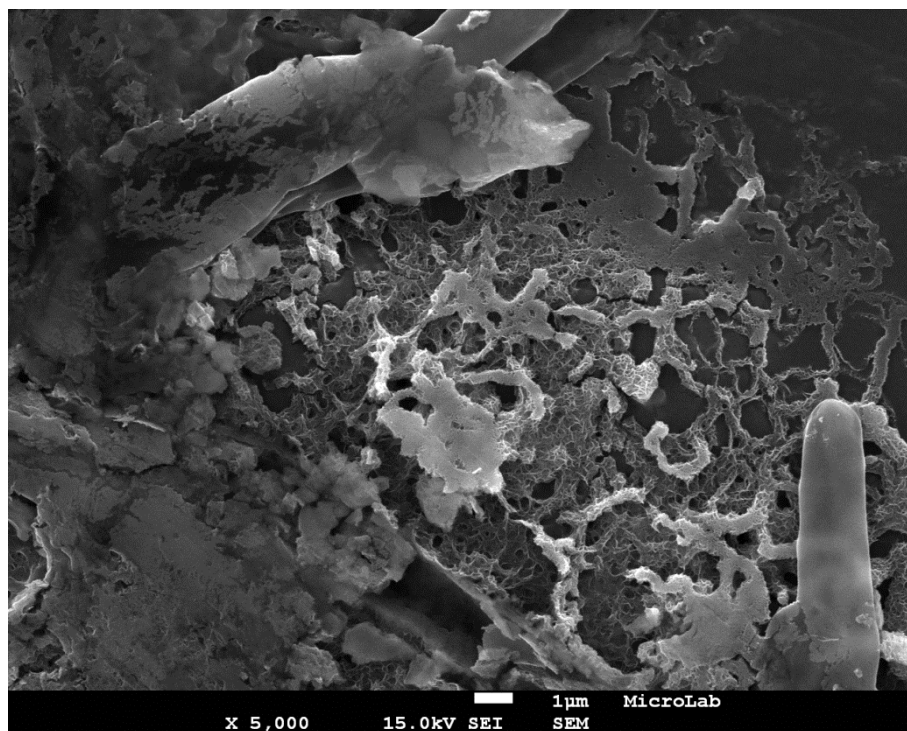


Figura 3.67. Agregados empaquetados y con superficies lisas de óxido de manganeso en cultivos de *Paraphaeosphaeria* sp.

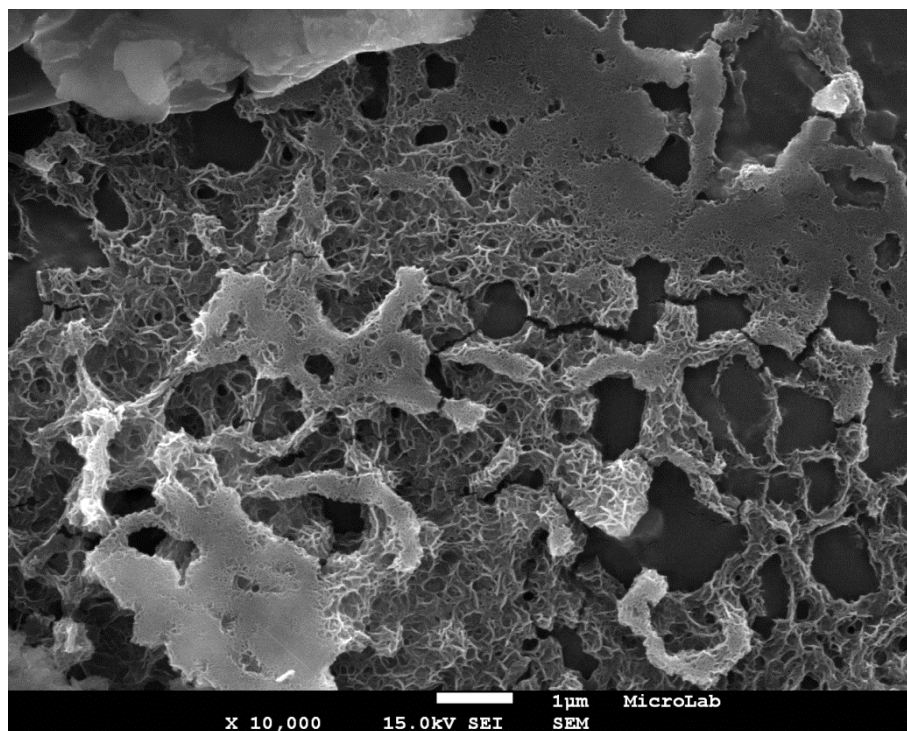


Figura 3.68. La figura anterior ampliada.

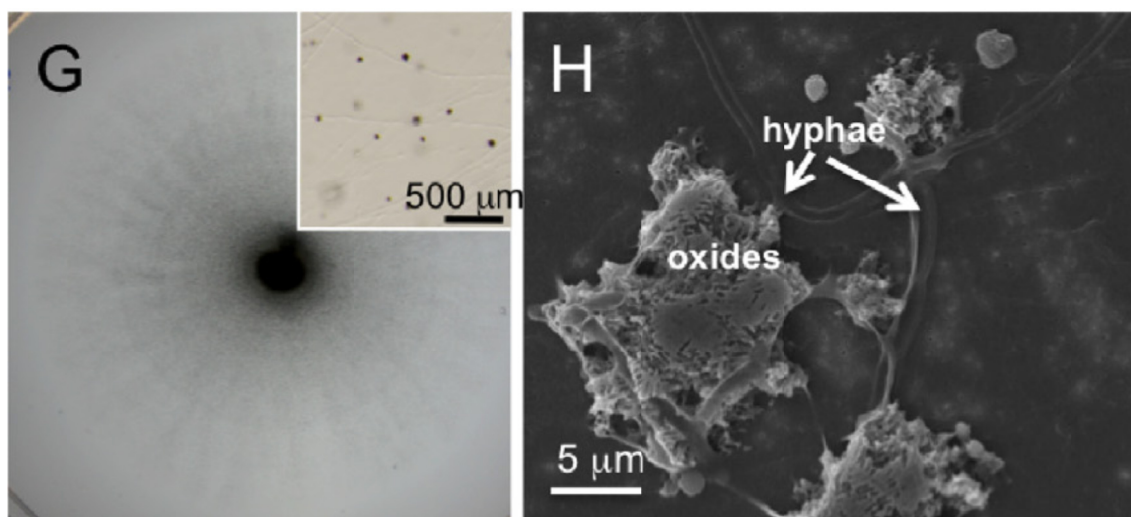


Figura 3.69. Imágenes al microscopio óptico (izquierda) y al SEM (derecha), del hongo *Acremonium strictum* cultivado en medio suplementado con 200 mM Mn^{2+} . La imagen de la derecha corresponde a cultivo en medio sólido y muestra la relación entre las hifas y el óxido de manganeso (adaptado de Santelli et al., 2010).

3.5.10. *Acremonium nepalense*

La cepa de *Acremonium nepalense*, aislada de la cueva de Lascaux, tiene la capacidad para inducir óxidos de manganesos biogénicos (Saiz-Jimenez et al., 2012). Se seleccionó este hongo por existir estudios previos que demostraban la formación de birnesita, lo que nos permitía tener un modelo de ese óxido de manganeso biogénico, ya que se identificó tanto en el medio natural: manchas negras sobre sedimentos arcillosos de la cueva (Figura 3.70), como en los cultivos de laboratorio (Saiz-Jimenez et al., 2012).

En primer lugar se efectuó un estudio al microscopio óptico de las hifas del hongo crecido en medio sin manganeso y en medio con manganeso. Como era de esperar en el primer caso las hifas estaban exentas de óxido de manganeso (Figura 3.71), mientras que en el medio con manganeso, este rodeaba las hifas y se encontraron también agregados de óxido de manganeso en sus alrededores (Figura 3.72).

En las imágenes FESEM se pudo observar este proceso más nítidamente (Figura 3.73), apreciándose que los agregados esféricos de óxido de manganeso, eran semejantes a los observados en el medio natural (Figuras 3.74).

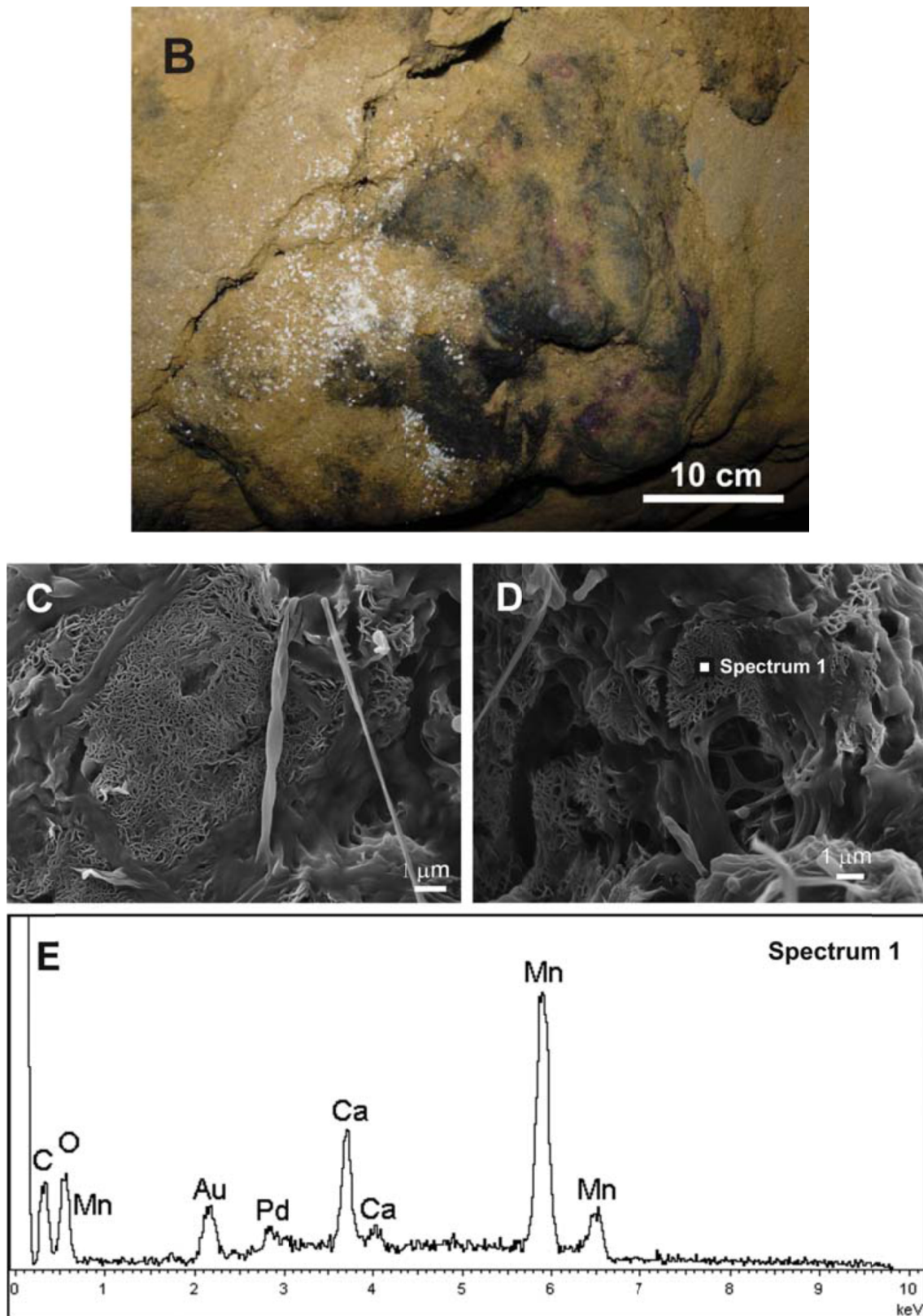


Fig. 3.70. B. Mancha negra sobre sedimento arcilloso de la Cueva de Lascaux, Francia. C y D. Imágenes FESEM de la mancha negra que muestran el óxido de manganeso con su estructura característica y algunas hifas fúngicas. E. Espectro EDS, que indica que el óxido de manganeso es birnesita cálcica (modificado de Saiz-Jimenez et al., 2012).

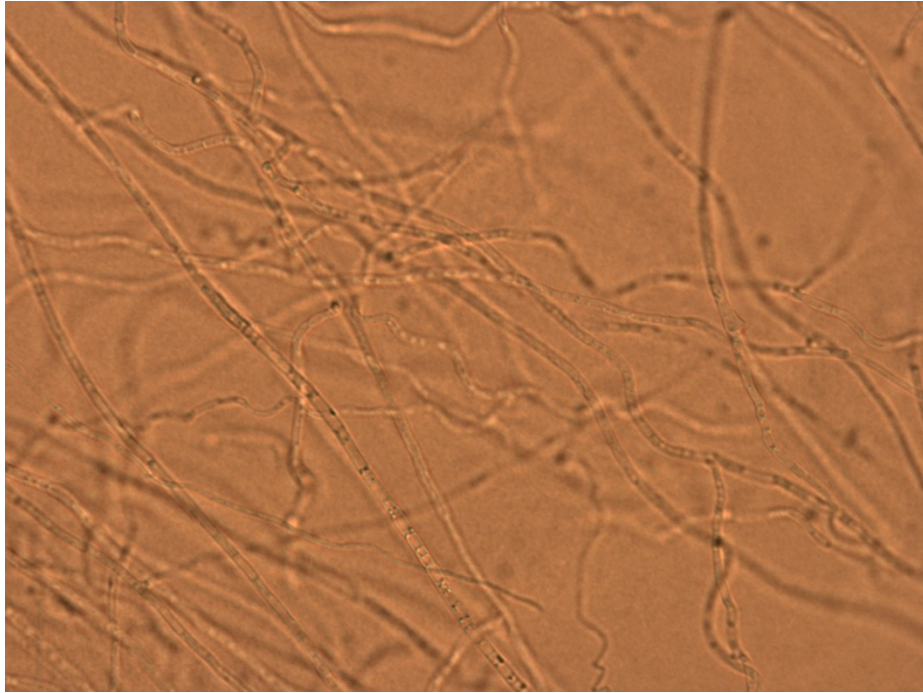


Figura 3.71. Hifas de *Acremonium nepalense* en medio AY sin manganeso.

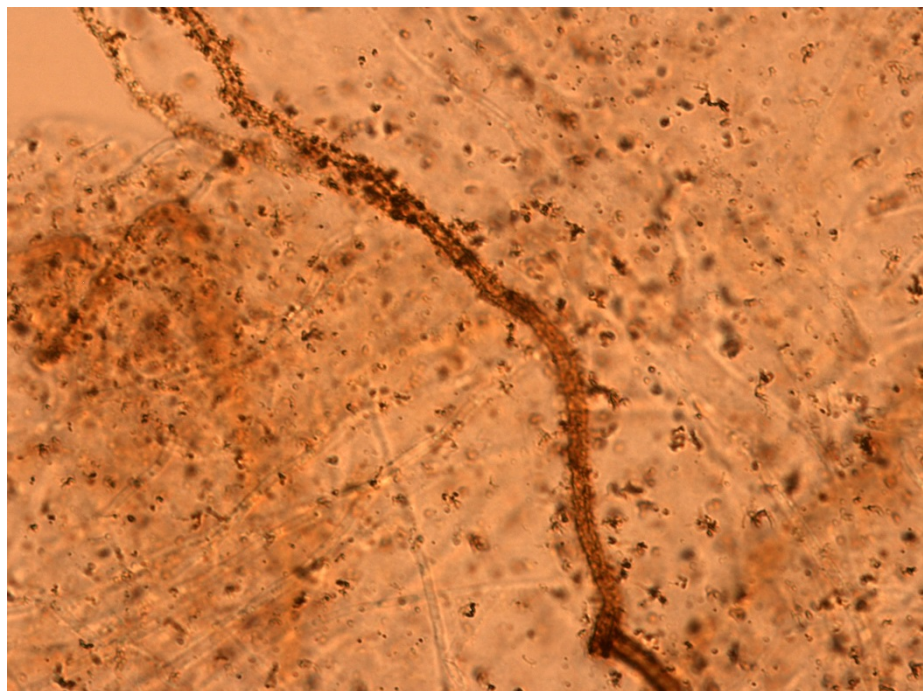


Figura 3.72. Hifas de *Acremonium nepalense* en medio AY con manganeso. Se observa la deposición de óxido de manganeso sobre su superficie.

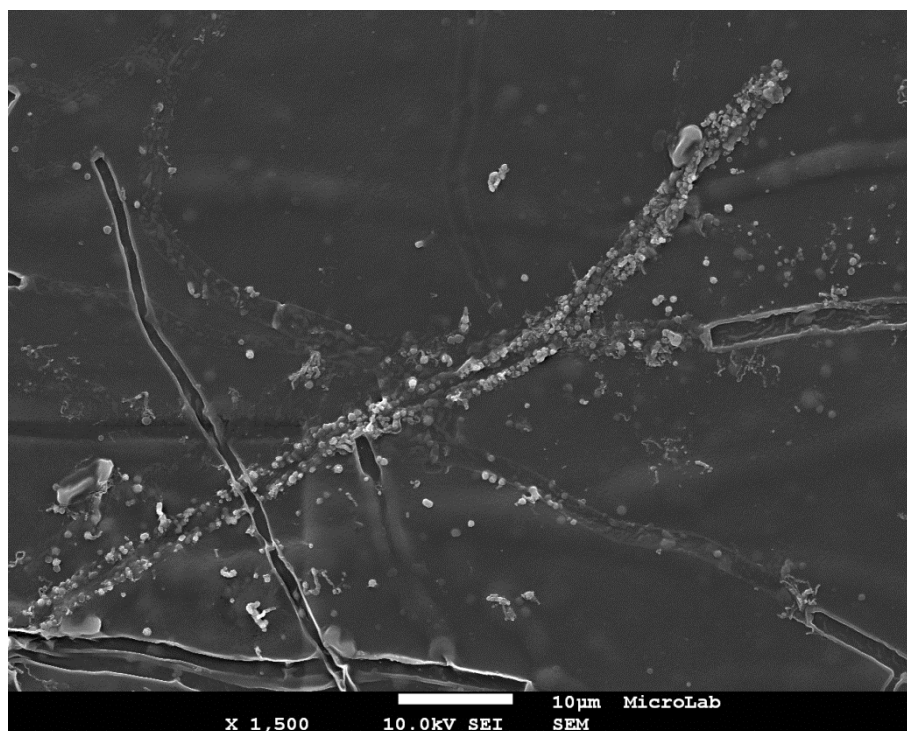


Figura 3.73. Imagen FESEM de hifas de *Acremonium nepalense* en medio AY con manganeso. Se observa la deposición de óxido de manganeso sobre su superficie y zonas próximas.

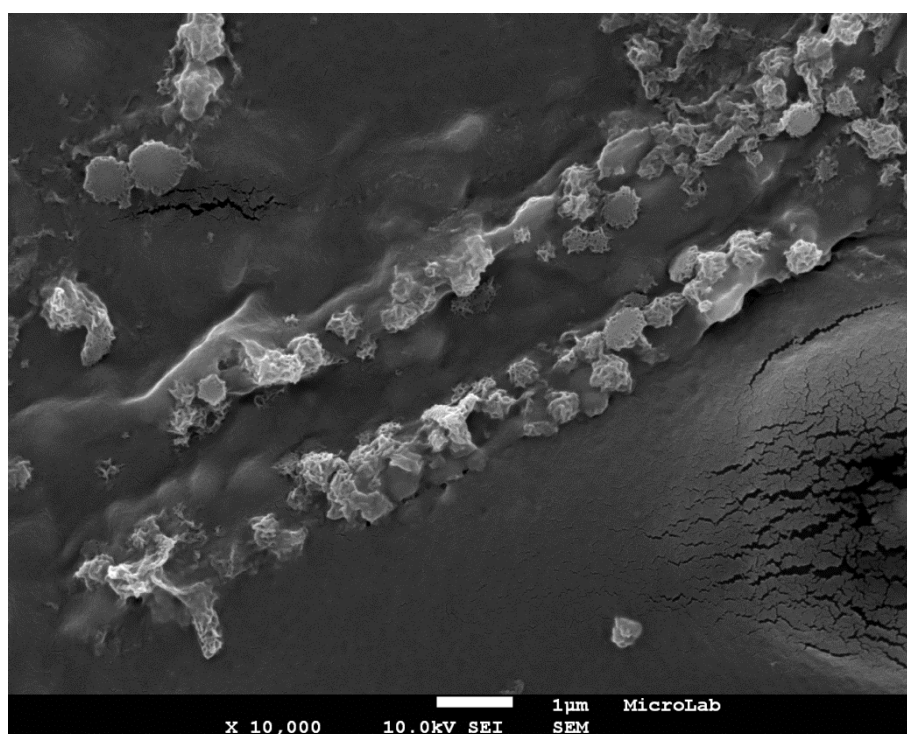


Figura 3.74. Imagen FESEM de hifas de *Acremonium nepalense* mostrando la deposición de óxido de manganeso sobre la superficie.

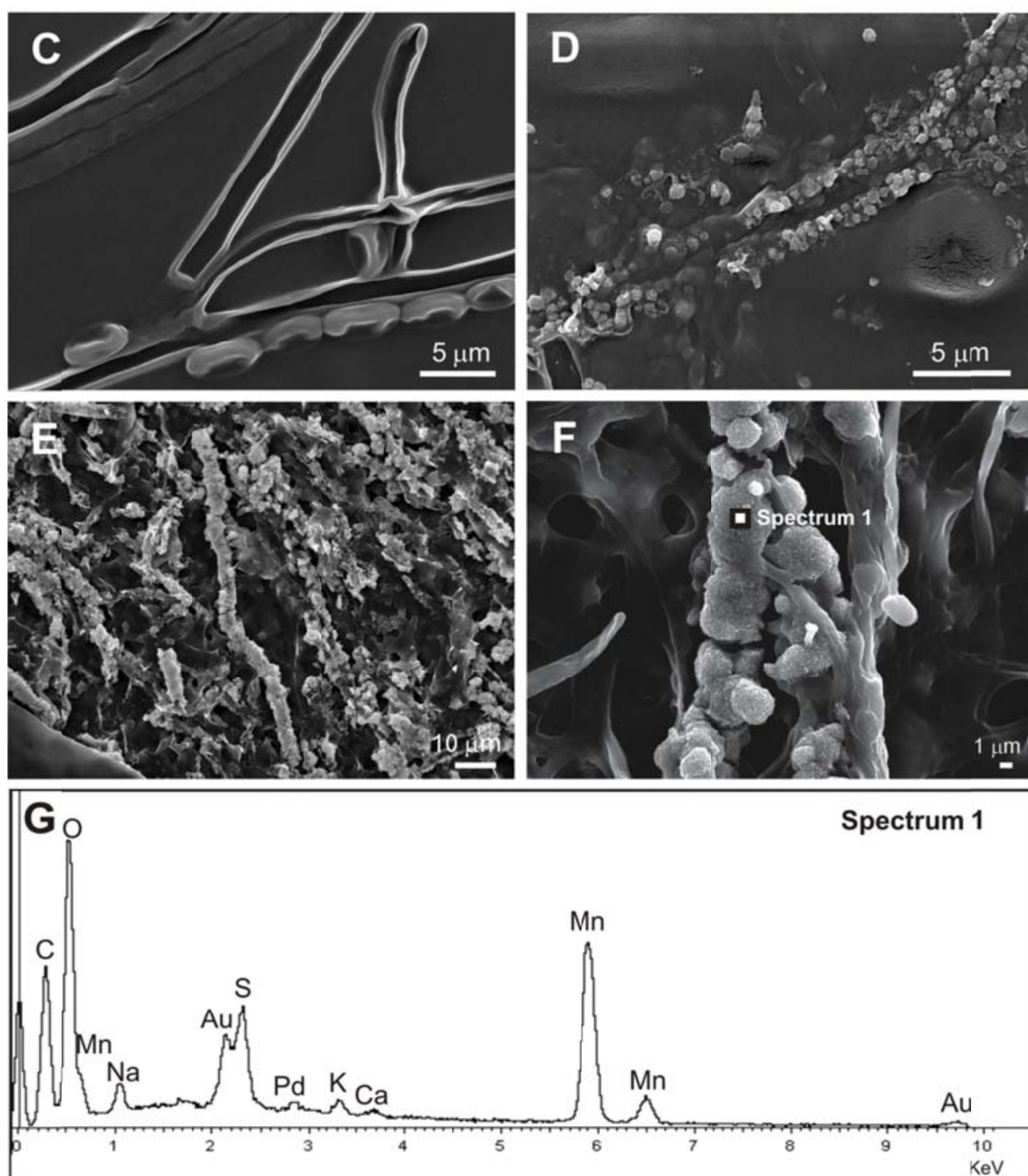


Figure 3.75. Cultivo de *Acremonium nepalense*. C: Imagen FESEM de *A. nepalense* cultivado en medio sólido AY sin manganeso. D: Imagen FESEM de *A. nepalense* cultivado en medio sólido AY con MnSO₄ mostrando los agregados biogénicos de óxido de manganeso depositados sobre las hifas. E: Imagen FESEM de *A. nepalense* después de 20 días de cultivo en medio líquido AY-HEPES con MnSO₄, donde muestra la extensión de la mineralización sobre las hifas. F: Imagen FESEM de hifa mineralizada con óxido de manganeso precipitado sobre su superficie. G: Espectro del microanálisis con rayos X obtenido en la position marcada como spectrum 1 en F, mostrando la presencia de óxido de manganeso (modificado de Saiz-Jimenez et al., 2012).

4. DISCUSSION FINAL

A lo largo de este estudio se ha demostrado la capacidad de oxidar el manganeso de algunas especies de hongos, aislados de diversos enclaves de la Faja Pirítica Ibérica (FPI).

De un total de 32 aislamientos en cultivos puros, un primer ensayo consistente en el crecimiento de las distintas especies de hongos en el medio de cultivo sólido AY-Mn dio como resultado la posible participación de 12 cepas en este proceso. De entre ellas hay que hacer notar que *Ascochyta* sp. no presentó inicialmente una coloración marrón, que es la típica de los hongos que oxidan manganeso, sino una verde (Figura 3.21), aunque se incluyó inicialmente como positiva, aunque *Cladosporium sinuosum*, con reacción negativa, incrementó la coloración verde en el medio AY-Mn (Figura 3.23).

Por otra parte, *Myrothecium gramineum* (Figura 3.33) y *Pseudopithomyces chartarum* (Figura 3.25) produjeron una reacción marrón en el medio con manganeso, por lo que se seleccionaron como positivas, en principio.

El estudio más detallado, llevado a cabo con el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM), redujo el número de hongos que oxidaban manganeso a cinco de las cepas aisladas (incluyendo las dos cepas de *Acrostalagmus luteoalbus*), más el hongo *Acremonium nepalense*, utilizado como modelo (Tabla 4.1).

Para entender esta disparidad de resultados es necesario comprender la fisiología de los hongos y la capacidad de efectuar diferentes reacciones con un mismo substrato o elemento.

Mientras ha quedado claro que las cinco especies de hongos que depositan el manganeso en la superficie de sus hifas, como se ha demostrado con el estudio FESEM, poseen la capacidad de oxidar el Mn(II), el oscurecimiento de los micelios en las placas con medio AY-Mn de los siete restantes ha de deberse a otras causas.

Uno de los posibles mecanismos pudiera ser que el manganeso induciría la producción de pigmentos en el hongo, lo que daría lugar al oscurecimiento del medio.

En la literatura existen un importante número de publicaciones sobre el papel del manganeso en la inducción de enzimas. Así, los hongos basidiomicetos tienen la capacidad de producir varias oxidasas, tales como lacasas y manganeso peroxidasas, que son las más importantes en la degradación de la lignina (Arfi et al., 2013). Sin embargo, no solo los basidiomicetos, sino también los ascomicetos producen lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa (Bonugli-Santos et al., 2010), e incrementan su actividad en condiciones de salinidad, lo que también fue observado por Arfi et al. (2013) para los basidiomicetos.

Tabla 4.1. Hongos con reacción de manganeso inicialmente positiva en medio de cultivo y demostración de su presencia mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.

Código	Procedencia	Identificación	Reacción Mn en cultivo	Presencia Mn FESEM
HM1.1	Mina Pepito	<i>Ascochyta</i> sp.	Positiva	Negativa
HM2.1	Mina Pepito	<i>Bartalinia robillardoides</i>	Positiva	Positiva
MH0413_H3.3	Mina Pepito	<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	Positiva	Positiva
MH0413_H3.4	Mina Pepito	<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	Positiva	Positiva
MH0413_H4.1	Mina Pepito	<i>Myrothecium gramineum</i>	Positiva	Negativa
MH0413_H4.2	Mina Pepito	<i>Pseudopithomyces chartarum</i>	Positiva	Negativa
MH0413_H4.3	Mina Pepito	<i>Pseudopithomyces chartarum</i>	Positiva	Dudosa
MH0413_H5.1	Mina Pepito	<i>Pseudopithomyces chartarum</i>	Positiva	Negativa
MH0413_H5.2	Mina Pepito	<i>Myrothecium gramineum</i>	Positiva	Negativa
MH0413_H7.1	Peña del Hierro	<i>Alternaria tenuissima/A. alternata</i>	Positiva	Negativa
MH0413_H7.2	Peña del Hierro	<i>Drechslera avenae</i>	Dudosa	Positiva
MH0413_H13.5	Mina Poderosa	<i>Paraphaeosphaeria</i> sp.	Positiva	Positiva
LXM1.1 (control)	Cueva de Lascaux	<i>Acremonium nepalense</i>	Positiva	Positiva

Las lacasas son enzimas con actividad fenoloxidasa que contienen cobre y catalizan la oxidación de un electrón de varios compuestos aromáticos, como los fenoles, mientras reducen el oxígeno molecular a agua. Las manganeso peroxidasas son enzimas extracelulares que catalizan la oxidación de Mn^{2+} (dependiente del H_2O_2) al altamente reactivo Mn^{3+} . Este último es estabilizado por quelación con ácidos dicarboxílicos para formar el complejo Mn^{3+} -ácido dicarboxílico, que es un oxidante altamente reactivo, que se difunde lejos del centro activo del enzima debido a su bajo peso molecular y, por tanto, oxida una variedad de compuestos fenólicos y no fenólicos (Asgher et al., 2008).

El aumento en la concentración de Mn^{2+} incrementa la actividad de la manganeso peroxidasa. Elhami et al. (2008) demostraron que el manganeso tiene una marcada influencia en el metabolismo del basidiomiceto *Pleurotus florida*. Diferentes concentraciones de manganeso influenciaron significativamente el crecimiento lineal del micelio, la producción de cuerpos fructíferos y el contenido en proteínas. Otros autores (Thurston, 1994; Baldrian et al., 2005) han comprobado que la adición de manganeso a los medios de cultivos tiene un efecto estimulante en el crecimiento de los micelios, así como afecta positivamente a la producción de enzimas.

La presencia de manganeso parece ser crucial para el funcionamiento de enzimas dependientes del manganeso e intervendría en la regulación de la actividad de los enzimas extracelulares. Concretamente la lacasa y peroxidasa intervienen en la polimerización de fenoles tanto in vitro como en medios de cultivo de hongos dando lugar a la formación de polímeros fenólicos extracelulares, semejantes a las melaninas, como demostraron varios autores (Martin y Haider, 1969; Haider y Martin, 1970; Saiz-Jimenez et al., 1975).

Thurston (1994) describió como *Aspergillus nidulans* poseía dos lacasas con funciones diferentes. Una de ellas estaría implicada únicamente en la formación del color verde del conidio, mientras que la segunda, localizada en el cleistotecio, estaría implicada en la síntesis de pigmento. Este pudiera ser el caso de *Ascochyta* sp. En otros hongos, como *Daldinia concentrica* y *Lentinus edodes*, la actividad de la lacasa está asociada a la formación de pigmento en otras estructuras. Por ejemplo, la formación de cuerpos fructíferos implica la síntesis de pigmentos extracelulares catalizados por una fenoloxidasa. Estos pigmentos son productos de una polimerización oxidativa y dan un color marrón, que pudiera ser el caso de los otros dos hongos: *Myrothecium gramineum* y *Pseudopithomyces chartarum*.

Es muy posible que el medio AY-Mn aumente los niveles de enzimas que intervienen en la producción y polimerización de fenoles y, como consecuencia, ello se manifieste en el oscurecimiento de los micelios. Por tanto, este oscurecimiento no necesariamente estaría relacionado con la oxidación del

manganeso y explicaría la ausencia de óxido de manganeso en los siete hongos que, aparentemente, dan reacción positiva en el medio AY-Mn.

De los cinco hongos que en el estudio FESEM mostraron la presencia de manganeso en sus hifas, tres de ellos: *Bartalinia robillardoides*, *Acrostalagmus luteoalbus* y *Drechslera avenae* no han sido descritos en la literatura científica como oxidantes del manganeso, por lo que representan nuevas aportaciones de esta tesis.

De *Paraphaeosphaeria* sp. existe una publicación que lo relaciona con el manganeso, aunque los datos son confusos, debido a la nomenclatura taxonómica. Takano et al. (2006) aislaron dos cepas oxidantes del manganeso (WL-1 y WL-2) de un hábitat acuático rico en manganeso en Japón, que mediante el estudio del 18S rRNA incluyeron en un clado con especies de los géneros *Paraphaeosphaeria* y *Coniothyrium*, si bien con los genes ITS1 e ITS2 rRNA se incluyeron dentro del género *Coniothyrium* y lejos de *Paraphaeosphaeria*. Sasaki et al. (2006b) identificó como semejante a *Paraconiothyrium* sp. otra cepa oxidante del manganeso.

Verkley et al. (2014) estudiaron los hongos semejantes a *Coniothyrium* (*Coniothyrium*-like) que incluyen varios géneros: *Coniothyrium*, *Paraconiothyrium*, *Paraphaeosphaeria*, entre otros, concluyendo que es necesario un profundo estudio molecular para delimitar las especies de los distintos géneros.

Otros autores (Miyata et al. 2006) aislaron varias cepas de hongos oxidantes del manganeso, algunos de dudosa identificación. Una de ellas presentó gran similitud con las secuencias de *P. pileata* y *P. michotii*, por lo que la asignó a este género.

Ante la indefinición en la identificación de la especie de las cepas aisladas por Takano et al. (2006) y Sasaki et al. (2006b) y dada la afirmación de que las cepas WL-1 y WL-2 están alejadas de *Paraphaeosphaeria* se podría considerar que nuestra especie de *Paraphaeosphaeria* representaría la segunda cita de este género de hongos oxidantes del manganeso, tras la encontrada por Miyata et al. (2006).

Mención aparte merece las tres cepas de *Pseudopithomyces chartarum* que presentaron reacción positiva para el medio AY-Mn, pero en las que no se detectó óxido de manganeso en sus hifas, salvo en una cepa (MH0413_H4.3), que resultó dudosa.

El hongo *Pseudopithomyces chartarum* tiene varios sinónimos: *Leptosphaerulina chartarum*, *Pithomyces chartarum*, *Sporidesmium bakeri*, *Sporidesmium bakeri* var. *bakeri*, *Sporidesmium bakeri* var. *faureae*,

Sporidesmium bakeri var. *sacchari* y *Sporidesmium chartarum* (Perelló et al., 2017). En la literatura se encuentran varios artículos donde señalan a *Pithomyces chartarum* como una especie oxidante del manganeso (Santelli et al., 2010; Tang et al., 2013). Sin embargo, esto no fue tan evidente en el estudio de nuestras tres cepas al FESEM, aunque en placa de Petri con medio AY-Mn dieron reacción positiva.

En muchos casos, las condiciones de cultivo pueden alterar la fisiología de los microorganismos y se hace necesario estudiar más profundamente estas tres cepas de *Pseudopithomyces chartarum* para comprobar si definitivamente oxidan o no el manganeso.

Los óxidos de manganeso biogénicos encontrados en la naturaleza parecen ser comparables con los producidos en el laboratorio por los microorganismos, particularmente los filomanganatos pobremente cristalizados tales como el δ - MnO_2 , la birnesita ácida o la buserita (Tebo et al., 2004).

Una revisión de la literatura existente sobre los óxidos de manganeso biogénicos revela que generalmente las bacterias producen un filomanganato de estructura laminar similar a la birnesita (Tebo et al., 2004; Spiro et al., 2010). Los minerales del grupo de la birnesita varían en simetría (hexagonal, pseudooctogonal). La birnesita hexagonal puede sufrir transformaciones abióticas y envejecer a fases más cristalinas (mas energéticamente favorables) tales como la birnesita triclinica, la todorokita y la feiticnechtita (Hansel, 2017).

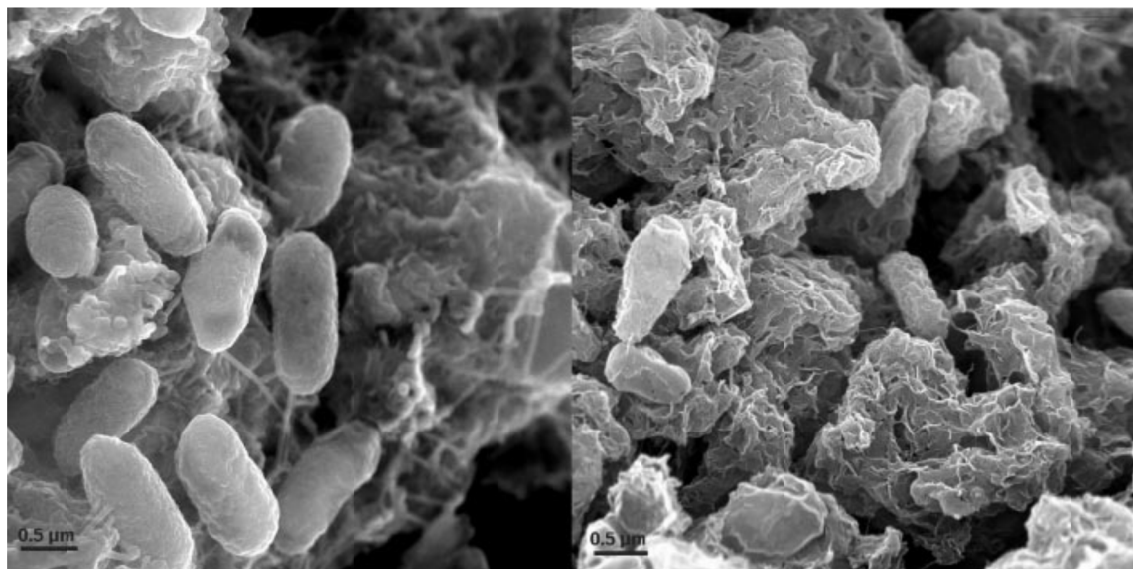


Figura 4.1. Imagen SEM de óxido de manganeso formado por *Pseudomonas putida* (Tebo et al., 2004).

En el caso de los hongos, unos pocos trabajos identificaron la birnesita hexagonal y la todorokita como productos de la oxidación fúngica del Mn(II) (Miyata et al., 2006; Saratovsky et al., 2009; Grangeon et al., 2010). Santelli et al. (2011) indicaron que la especie fúngica y las condiciones de cultivo en el laboratorio influyeron en la conversión del filomanganato biogénico a fases más ordenadas, como la todorokita y la birnesita triclinica. Estas diferencias de especie fúngica y cultivo han podido darse en nuestro caso, ya que los óxidos de manganeso presentaron estructuras diferentes.

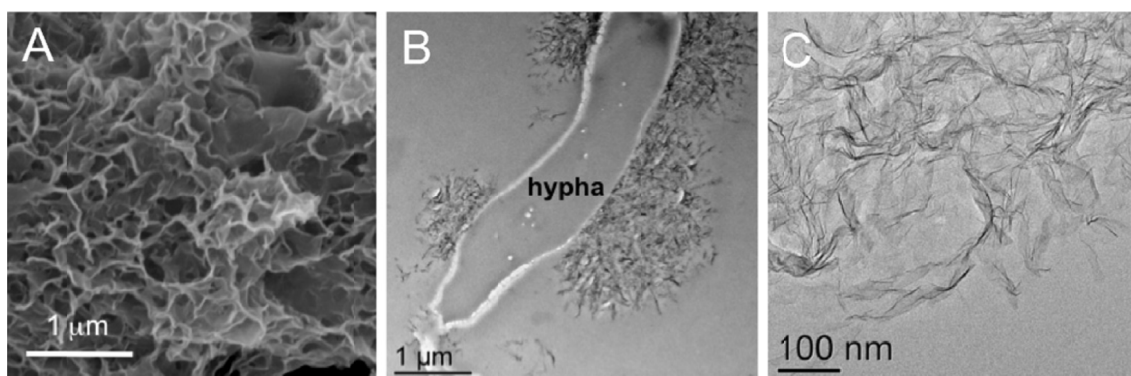


Figura 4.2. Imágenes SEM, TEM y HR-TEM de óxido de manganeso producido por *Plectosphaerella cucumerina*. A: SEM de las láminas de óxido de manganeso formado sobre la hifa que se muestra en la imagen TEM de B. C: Imagen HR-TEM mostrando la morfología en forma de hoja arrugada del óxido de manganeso (Santelli et al., 2011).

En efecto, en los cinco hongos que en el estudio FESEM mostraron la presencia de manganeso en sus hifas, el mineral no presentó una misma morfología. En los hongos investigados: *Bartalinia robillardoides*, *Acrostalagmus luteoalbus* (dos cepas), *Drechslera avenae*, *Paraphaeosphaeria* sp. y el hongo modelo *Acremonium nepalense*, se pueden diferenciar distintas morfologías:

Depósito de óxido de manganeso en forma de agregados esféricos sobre la superficie de las hifas, representado por los hongos *Acremonium nepalense* y *Acrostalagmus luteoalbus*.

Precipitación de óxido de manganeso en forma de placas sobre la superficie de las hifas, llegando a recubrirlas total o parcialmente, como en *Bartalinia robillardoides*. En el primer caso llega a formar una gruesa vaina de mineral alrededor de la hifa.

Proceso mixto, donde junto al depósito de agregados esféricos junto a las hifas. Sobre la superficie de las hifas también se depositan placas de mineral formado una vaina que la cubre totalmente. Este proceso está representado por *Drechslera avenae*.

Precipitación de óxido de manganeso en forma de masas de morfología irregular con superficies aplanadas, representativo de *Paraphaeosphaeria* sp. La cepa dudosa de *Pseudopithomyces chartarum* también parece pertenecer a este tipo.

En base a las morfologías descritas por otros autores y a las observadas en nuestras cepas de hongos se puede sugerir que los hongos estudiados han oxidado el Mn(II) a birnesita en los casos de *Acrostalgmus luteoalbus*, *Drechslera avenae* y *Acremonium nepalense*. Las hifas mineralizadas de *Bartalinia robillardoides* tienen semejanza con las de hongos que precipitan birnesita triclinica. Por otra parte, *Paraphaeosphaeria* sp. parece precipitar birnesita y todorokita conjuntamente.

Finalmente, en este trabajo se ha puesto de manifiesto la importancia de la biogénesis del manganeso en la Faja Pirítica Ibérica y la presencia de especies de hongos que contribuyen a su insolubilización mediante la oxidación del Mn(II) a Mn(III, IV).

5. CONCLUSIONES

De las investigaciones efectuadas en esta tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. En las dos campañas de muestreos realizadas en la Faja Pirítica Ibérica se aislaron 32 cepas de hongos en cultivos puros, de las cuales solo 12 de ellas mostraron reacción positiva en medio AY-Mn.
2. Cuando se estudiaron las cepas al microscopio electrónico de barrido de emisión de campo solo cinco de ellas mostraron claramente la capacidad de oxidar manganeso y depositarlo sobre sus hifas, más otra cepa, que resultó dudosa: *Pseudopithomyces chartarum* y que requiere posteriores estudios para poder confirmar su implicación en el proceso.
3. Las cepas que mostraron una clara oxidación del manganeso fueron: *Bartalinia robillardoides*, dos cepas de *Acrostalagmus luteoalbus*, *Drechslera avenae*, *Paraphaeosphaeria* sp. y *Acremonium nepalense*. La capacidad de oxidar manganeso en este último hongo ya era conocida y se ha empleado en esta tesis como especie modelo.
4. *Bartalinia robillardoides*, *Acrostalagmus luteoalbus* y *Drechslera avenae* no han sido descritos en la literatura científica como oxidantes del manganeso, por lo que representan nuevas aportaciones al ciclo biogeoquímico de manganeso.
5. Los cinco hongos que en el estudio FESEM se mostraron capaces de oxidar el manganeso, lo hicieron de manera diferente, a juzgar por la estructura del óxido de manganeso observable al microscopio electrónico de barrido de emisión de campo:
 - (i) Depósito de óxido de manganeso en forma de agregados esféricos sobre la superficie de las hifas.
 - (ii) Precipitación de óxido de manganeso en forma de placas sobre la superficie de las hifas, llegando a recubrirlas total o parcialmente.
 - (iii) Proceso mixto, donde junto al depósito de agregados esféricos sobre la superficie de las hifas también se depositan placas de mineral.
 - (iv) Precipitación de óxido de manganeso en forma de masas de morfología irregular con superficies aplanadas.
6. En base a las morfologías descritas por otros autores y a las observadas en nuestras cepas de hongos se puede sugerir que los hongos estudiados han oxidado el Mn(II) a birnesita en los casos de *Acrostalagmus luteoalbus*, *Drechslera avenae* y *Acremonium nepalense*. Las hifas mineralizadas de *Bartalinia robillardoides* tienen semejanza con las de hongos que precipitan birnesita triclinica. Por otra parte,

Paraphaeosphaeria sp. parece precipitar birnesita y todorokita conjuntamente.

7. Se ha puesto a punto un nuevo método de obtención de birnesita sintética, que precipita inmediatamente, frente a los 3-5 días de otros métodos publicados. Esta birnesita es comparable a las descritas en la literatura y puede servir de modelo para estudios sobre la oxidación biogénica del manganeso.

6. REFERENCIAS

Amaral Zettler, L.A., Gomez, F., Zettler, E., Keenan, B.G., Amils, R., Sogin, M.L. 2002. Eukaryotic diversity in Spain's river of fire. *Nature* 417, 137.

Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M., Legge, R.L. (2008). Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19, 771-783.

Arfi, Y., Chevret, D., Henrissat, B., Berrin, J-G., Levasseur, A., Record, E. 2013. Characterization of salt-adapted secreted lignocellulolytic enzymes from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. *Nat. Comm.* 4: 1810. DOI: 10.1038/ncomms2850.

Baldrian, P., Valášková, V., Merhautová, V., Gabriel, J. 2005. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Res. Microbiol.* 156, 670-676.

Barriga, F.J.A.S., Carvalho, D., Ribeirp, A. 1997. Introduction to the Iberian Pyrite Belt. En: Barriga, F.J.A.S., Carvalho, D., eds. *Geology and VMS Deposits of the Iberian Pyrite Belt. Guidebook Series vol. 27*, 1-20.

Bhattacharyya, P. 1975. Active transport of manganese in isolated membrane vesicles of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 123, 123-127.

Biolab Medical Unit. 2015. Manganese (www.biolab.co.uk/docs/manganese.pdf).

Camara, M.P.S., Palm, M.E., van Berkum, P., Stewart, E.L. 2001. Systematics of *Paraphaeosphaeria*: a molecular and morphological approach. *Mycol. Res.* 105, 41-56.

Carmichael, M.J., Carmichael, S.K., Santelli, C.M., Strom, A., Bräuer, S.L. 2013. Mn(II)-oxidizing bacteria are abundant and environmentally relevant members of ferromanganese deposits in caves of the Upper Tennessee River Basin, *Geomicrobiol. J.* 30, 779-800.

Da Cunha, K.C., Sutton, D.A., Gené, J., Cano, J., Capilla, J., Madrid, H., Decock, C., Wiederhold, N.P., Guarro, J. 2014. *Pithomyces* species (Montagnulaceae) from clinical specimens: identification and antifungal susceptibility profiles. *Med. Mycol.* 52, 748-757.

Das A.P., Sukla, L.B., Pradham, N., Nayak, S. 2011. Manganese biomining: a review. *Bioresour. Technol.* 102, 7381-7387.

De Maeseneire, S.L., 2007. *Myrothecium gramineum* as a novel fungal expression host. Ph D thesis. Ghent University.

Dingley, J.M. 1962. *Pithomyces chartarum*, its occurrence morphology, and taxonomy, New Zealand J. Agric. Res. 5, 49-61.

Elhami, B., Ansari, N.A., Dehcordie, F.S. 2008. Effect of substrate type, different levels of nitrogen and manganese growth and development of oyster mushroom (*Pleurotus florida*). Dynam. Biochem. Process Biotechnol. Mol. Biol. 2, 34-37.

Frost, R.L., Matt Weier, M., Martinez-Frias, J., Rull, F., Reddy, B.J. 2007. Sulphate efflorescent minerals from El Jaroso Ravine, Sierra Almagrera-An SEM and Raman spectroscopic study. Spectrochim. Acta Part A 66, 177-183.

Fuentes, J.L., Huss, V.A.R., Montero, Z., Torronteras, R., Cuaresma, M., Garbayo, I., Víchez, C. 2016. Phylogenetic characterization and morphological and physiological aspects of a novel acidotolerant and halotolerant microalga *Coccomyxa onubensis* sp. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). J. Appl. Phycol 28, 3269-3279.

Gams, W., Zare, R., Summerbell, R.C. 2005. Proposal to conserve the generic name *Verticillium* (anamorphic Ascomycetes) with a conserved type. Taxon 54, 179.

Grangeon S., Lanson B., Miyata N., Tani Y., Manceau A. 2010. Structure of nanocrystalline phyllo-manganates produced by freshwater fungi. Am. Mineral. 95, 1608-1611.

CRS Ingeniería 2014. Plan de Investigación. Concurso público para la adjudicación de las actividades extractivas de explotación de los recursos existentes en la reserva minera de Aznalcóllar (Sevilla). Magtel-Grupo México.

Gómez, F., Rodríguez-Manfredi, J.A., Rodríguez, N., Fernández-Sampedro M., Caballero-Castrejón, F.J., Amils, R., 2012. Habitability: Where to look for life? Halophilic habitats: Earth analogs to study Mars habitability. Planet Space Sci. 68, 48-55.

Gönczöl, J., Révay, Á. 2004. Fungal spores in rainwater: stemflow, throughfall and gutter conidial assemblages. Fungal Divers. 16, 67-86.

Gottschalk, G. 1986. Bacterial Metabolism. 2nd edition. Springer, Berlin.

Greene, A. C.; Madgwick, J. C. Microbial formation of manganese oxides. Appl. Environ. Microbiol. 1991, 57, 1114-1120.

Grum-Grzhimaylo, A.A., Georgieva, M.L., Bondarenko, S.A., Debets, A.J.M., Bilanenko, E.N. 2016. On the diversity of fungi from soda soils. Fungal Divers. 76, 27-74.

Haider, K., Martin, J.P. 1970. Humic acid-type phenolic polymers from *Aspergillus sydowi* culture medium, *Stachybotrys* ssp. cells and autooxidized phenols mixtures. Soil Biol. Biochem. 2, 145-156.

Hansel, C.M. 2017. Manganese in marine microbiology. Adv. Microb. Physiol. 70, 37-83.

Henricot B. 2010. First report of *Ascochyta dolomitica* causing leaf spots on *Hepatica acutiloba* in the UK. New Dis. Rep. 22, 30.

Herbert, R.B. 1997. Properties of goethite and jarosite precipitated from acidic groundwater, Dalarna, Sweden. Clay Clay Min. 45, 261-273.

Hujšlová, M., Kubátová, A., Kostovčík, M., Kolařík, M. 2013. *Acidiella bohémica* gen. et sp. nov. and *Acidomyces* spp. (Teratosphaeriaceae), the indigenous inhabitants of extremely acidic soils in Europe. Fungal Divers. 58, 33-45.

Hutner, H. 1972. Inorganic Nutrition. Annual Review of Microbiology Vol. 26:313-346.

Jiang, S., Kim, D-G., Kim, J., Ko, S-O. 2010. Characterization of the biogenic manganese oxides produced by *Pseudomonas putida* strain MnB1. Environ. Eng. Res. 15, 183-190.

Krumbein, W.E. 1971. Manganese-oxidizing fungi and bacteria. Naturwissenschaften 58, 56-57.

Lambers, H., Hayes, P.E., Laliberté, E., Oliveira, R.S., Turner, B.L. 2015. Leaf manganese accumulation and phosphorous-acquisition efficiency. Trends Plant Sci. 20, 83-90.

López-Archilla, A.I. 2005. Riotinto: un universo de mundos microbianos. Ecosistemas 14, 52-65.

Lotze, F. 1945. Zur gliederung der Variszischen der Iberischen Meseta. Geotektonische Forschungen, 6, 78-92. Traducción de Ríos, J.M. 1959. Publ. Extr. Geol. Esp., 5, 149-166.

Mandelstam, J., McQuillem, K. 1973. Biochemistry of Bacterial Growth, 2nd edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Mandernack, K.W., Post, J., Tebo, B.M. 1995. Manganese mineral formation by bacterial spores of the marine *Bacillus* strain SG-1: Evidence for the direct oxidation of Mn(II) to Mn(IV). Geochim. Cosmochim. Acta 59, 4393-4408.

Marshall, K.C. 1979. Biogeochemistry of manganese minerals. En: Trudinger, P.A., Swaine, D.J. eds. Biogeochemical Cycling of Mineral-Forming Elements. Elsevier, Amsterdam, pp. 253-292.

- Martin, J.P., Haider, K. 1969. Phenolic polymers of *Stachybotrys atra*, *Stachybotrys chartarum* and *Epicoccum nigrum* in relation to humic acid formation. Soil Sci. 107, 260-270.
- Melim, L.A., Northup, D.E., Spilde, M.N., Jones, B., Boston, P.J., Bixby, R.J. 2008. Reticulated filaments in cave pool speleothems: microbe or mineral? J. Cave Karst Stud. 70, 135-141.
- Mel'nik, V.A. 1977. Key to the fungi of the genus *Ascochyta* Lib. (Coelomycetes). Parey Buchverlag Berlin.
- Miller, A.Z., Dionísio, A., Sequeira Braga MA., Hernández-Mariné, M., Afonso, M.J., Muralha, V.S.F., Herrera, L.K., Raabe, J., Fernandez-Cortes, A., Cuezva, S., Hermosin, B., Sanchez-Moral, S., Chaminé, H., Saiz-Jimenez, C. 2012a. Biogenic Mn oxide minerals coating in a subsurface granite environment. Chem. Geol. 322-323, 181-191.
- Miller, A.Z., Hernández-Mariné, M., Jurado, V., Dionísio, A., Barquinha, P., Fortunato, E., Afonso, M.J., Chaminé, H.I., Saiz-Jimenez, C. 2012b. Enigmatic reticulated filaments in subsurface granite. Environ. Microbiol. Rep. 4, 596-603.
- Miyata N., Tani Y., Iwahori K., Soma M., 2004. Enzymatic formation of manganese oxides by an *Acremonium*-like hyphomycete fungus, strain KR21-2. FEMS Microbiol. Ecol. 47, 101-109.
- Miyata N., Maruo K., Tani Y., Tsuno H., Seyama H., Soma M., Iwahori K. 2006. Production of biogenic manganese oxides by anamorphic Ascomycete fungi isolated from streambed pebbles. Geomicrobiol. J. 23, 63-73.
- Mohammadi, A., Amini, Y. 2015. Molecular characterization and identification of *Acrostalagmus luteoalbus* from saffron in Iran. Agric. Sci. Dev. 4, 16-18.
- Mohanty, S., Ghosh, S., Nayak, S., Das, A.P. 2017. Isolation, identification and screening of manganese solubilizing fungi from low-grade manganese ore deposits. Geomicrobiol. J. 34, 309-316.
- Morgan-Jones, G., Nag Raj, T.R., Kendrick, B. 1972. Genera coelomycetarum. V. *Alpakesa* and *Bartalinia*. Can. J. Bot. 50, 877-882.
- Oaki, Y., Imai, H. 2007. One-pot synthesis of manganese oxide nanosheets in aqueous solution: Chelation-mediated parallel control of reaction and morphology. Angew. Chem. Int. Edit. 46, 4951-4955.
- Oggerin, M., Tornos, F., Rodríguez, N., del Moral, C., Sánchez-Román, M., Amils, R. 2013. Specific jarosite biomineralization by *Purpureocillium lilacinum*, an acidophilic fungi isolated from Río Tinto. Environ. Microbiol. 15, 2228-2237.

- Oliveira, J.T. 1990. South Portuguese Zone: Introduction. Stratigraphy and synsedimentary tectonism. En: PreMesozoic Geology of Iberia. Dallmeyer R.D., Martínez García E. (eds), Springer Verlag, Heidelberg, pp 333-347.
- Perelló, A., Aulicino, M., Stenglein, S.A., Labuda, R., Moreno, M.V. 2017. *Pseudopithomyces chartarum* associated with wheat seeds in Argentina, pathogenicity and evaluation of toxigenic ability. Eur. J. Plant Pathol. 148, 491-496.
- Pinedo Vara, I. 1963. Piritas de Huelva. Su historia, minería y aprovechamiento. Ed. Summa. Madrid.
- Post, J.E. 1999. Manganese oxide minerals: Crystal structures and economic and environmental significance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 3447-3454.
- Potter, R.M., Rossman, G.R. 1979. The tetravalent manganese oxides: identification, hydration, and structural relationships by infrared spectroscopy. Am. Mineral. 64, 1199-1218.
- Preston, N.C. 1948. Observations on the genus *Myrothecium* II. *Myrothecium gramineum* Lib. and two new species. Trans. Brit. Myc. Soc. 31, 271-276.
- Qin, M., Zhao, H., Yang, W., Zhou, Y., Li, F. 2016. A facile one-pot synthesis of three-dimensional microflower birnessite (δ -MnO₂) and its efficient oxidative degradation of rhodamine B. RSC Adv. 6, 23905.
- Radmer, R., Kok, B. 1975. Energy Capture in Photosynthesis: Photosystem II. Ann. Rev. Biochem. 44, 409-433.
- Robertshaw, H., Higgins, E. 2005. Cutaneous infection with *Alternaria tenuissima* in an immunocompromised patient. Brit. J. Dermatol. 153, 1047-1049.
- Roldán, A., Honrubia, M. 1990. Dos celomicetos, nuevos para la flora española, aislados en medio acuático. Anales Jard. Bot. Madrid 47, 3-9.
- Rosa, C.J.P., McPhie, J., Relvas, J.M.R.S. 2010. Type of volcanoes hosting the massive sulfide deposits of the Iberian Pyrite Belt. J. Volcan.Geotherm. Res. 194, 107-126.
- Roux, C., van Warmelo, K.T. 1990. Conidiomata in *Bartalinia robillardoides*. Mycol. Res. 94, 109-116.
- Sáez, R., Almodóvar, G.R., Pascual, E. 1996. Geological constraints on massive sulphide genesis in the Iberian Pyrite Belt. Ore Geol. Rev. 11, 429-451.

- Saiz-Jimenez, C., Haider, K., Martin, J.P. 1975. Anthraquinones and phenols as intermediates in the formation of dark colored humic acid-like pigments by *Eurotium echinulatum*. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 39, 649-653.
- Saiz-Jimenez, C., Miller, A.Z., Martin-Sanchez, P.M., Hernandez-Marine, M. 2012. Uncovering the origin of the black stains in Lascaux Cave in France. Environ. Microbiol. 14, 3220-3231.
- Santelli, C.M., Pfister, D.H., Lazarus, D., Sun, L., Burgos, W.D., Hansel, C.M. 2010. Promotion of Mn(II) oxidation and remediation of coal mine drainage in passive treatment systems by diverse fungal and bacterial communities. Appl. Environ. Microbiol. 76, 4871-4875.
- Santelli, C.M., Webb, S.M., Dohnalkova, A.C., Hansel, C.M. 2011. Diversity of Mn oxides produced by Mn(II)-oxidizing fungi. Geochim. Cosmochim. Acta 75, 2762-2776.
- Saratovsky I., Gurr S., Hayward M. 2009. The structure of manganese oxide formed by the fungus *Acremonium* sp. strain KR21–2. Geochim. Cosmochim. Acta 73, 3291-3300.
- Sasaki, K., Sakimoto, T., Endo, M., Konno, H. 2006a. FE-SEM study of microbially formed jarosites by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Mat. Trans. 47, 1155-1162.
- Sasaki, K., Matsuda, M., Hirajima, T., Takano, K., Konno, H. 2006b. Immobilization of Mn(II) ions by a Mn-oxidizing fungus *Paraconiothyrium* sp.-like strain at neutral pHs. Mat. Trans. 47, 2457-2461.
- Scaeteanu, G. V., Ilie, L., Calin, C. 2013. An overview on manganese in nature. Am. Chem. Sci. J. 33, 247-263.
- Scheinost, A.C., Daniel, H. 2005. Encyclopedia of Soils in the Environment. chapter Metal Oxides, pp. 428-438. Elsevier, Oxford.
- Sheridan, J.E. 1977. *Drechslera* spp. and other seed-borne pathogenic fungi in New Zealand cereals. N.Z. J. Agric. Res. 20, 91-93.
- Sisterna, M., Carranza, M. 2004. Occurrence of *Drechslera avenae* on durum wheat (*Triticum durum*) seed in Argentina. Austral. Plant Pathol. 33, 459-460.
- Spiro, T.G., Bargar, J.R., Sposito, G., Tebo, B.M. 2010. Bacteriogenic manganese oxides. Acc. Chem. Res. 43, 1-9.
- Sterflinger, K., Prillinger, H. 2001. Molecular taxonomy and biodiversity of rock fungal communities in an urban environment (Vienna, Austria). Anton. Leeuw. 80, 275-286.

Strauss, G.K. 1970. "Sobre la geología de la provincia piritífera del suroeste de la Península Ibérica y de sus yacimientos, en especial sobre la mina de pirita de Lousal (Portugal)". Mem. Inst. Geol. Min. Esp. 77, 1-266.

Strauss, G.K., Madel, J. 1974. Geology of massive sulphide deposits in the Spanish-Portuguese Pyrite Belt. Geol. Rundsch. 63, 191-211.

Sujith, P.P., Bharathi, P.A.L. 2011. Manganese oxidation by bacteria: Biogeochemical aspects. En: W.E.G. Müller (ed.), Molecular Biomineralization, Springer, Berlin, pp. 49-76.

Summerbell, R.C., Gueidan, C., Schroers, H-J., de Hoog, G.S., Starink, M., Arocha Rosete, Y., Guarro, J., Scott, J.A. 2011. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. Stud. Mycol. 68, 139-162.

Takano, K., Itoh, Y., Ogino, T., Kurosawa, K., Sasaki, K. 2006. Phylogenetic analysis of manganese-oxidizing fungi isolated from manganese-rich aquatic environments in Hokkaido, Japan. Limnology 7, 219-223.

Tang, Y., Zeiner, C.A., Santelli, C.M., Hansel, C.M. 2013. Fungal oxidative dissolution of the Mn(II)-bearing mineral rhodochrosite and the role of metabolites in manganese oxide formation. Environ. Microbiol. 15, 1063-1077.

Tebo, B.M., Bargar, J.R., Clement, B.G., Dick, G.J., Murray, K.J., Parker, D., Verity, R., Webb, S.M. 2004. Biogenic manganese oxides: Properties and mechanisms of formation. Annu. Rev. Earth Planet. Sci. 32, 287-328.

Tebo, B.M., Johnson, H.A., McCarthy, J.K., Templeton, A.S. 2005. Geomicrobiology of manganese(II) oxidation. Trends Microbiol. 13, 421-428.

Tebo, B.M., Geszvain, K., Lee, S-W. 2010. The molecular geomicrobiology of bacterial manganese (II) oxidation. En: L.L. Barton et al. (eds.), Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective, Springer, Dordrecht, pp. 285-308.

Tornos, F. 2006. Environment of formation and styles of volcanic massive sulfides: The Iberian Pyrite Belt. Ore Geol. Rev. 28, 259-307.

Trio Maseda, M., Guillermo Ortuño, M. 1993-1994. El Panorama Minero. IGME -Dirección General de Política Energética y Minas (Ministerio de Industria, Energía y Turismo).

Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology 140, 19-26.

Ulrich, T. 2007. Biogenic manganese oxides: Formation mechanisms, mineralogy and environmental relevance (<http://fliphtml5.com/djdk/ciaj/basic>).

U.S. Geological Survey. 2014. Minerals Yearbook (Volume I. Metals and Minerals).

Verkley, G.J.M., Dukik, K., Renfurm, R., Göker, M., Stielow, J.B. 2014. Novel genera and species of coniothyrium-like fungi in Montagnulaceae (Ascomycota). *Persoonia* 32, 25-51.

Villalobos, M., Toner, B., Bargar, J., Sposito, G. 2003. Characterization of the manganese oxide produced by *Pseudomonas putida* strain MnB1. *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 2649-2662.

Vodyanitskii, Yu.N., Vasil'ev, A.A., Lesovaya, S.N., Sataev, E.F., Sivtsov, A.V. 2004. Formation of manganese oxides in soils. *Eurasian Soil Sci.* 37, 572-584.

Walker, J.J., Spear J.R., Pace, N.R. 2005. Geobiology of a microbial endolithic community in the Yellowstone geothermal environment. *Nature* 434, 1011-1014.

Webb, S.M., Bargar, J.R., Dick, F.J., Tebo, B.M. 2005. Evidence for the presence of Mn(III) intermediates in the bacterial oxidation of Mn(II). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 5558-5563.

Wei, Z., Hillier, S., Gadd, G.M. 2012. Biotransformation of manganese oxides by fungi: solubilization and production of manganese oxalate biominerals. *Environ. Microbiol.* 14, 1744-1752.

